

Die spezifische Darstellbarkeit von Blutgefäßen der
NMRI-Maus während der Organogenese
mit Dolichos biflorus-Agglutinin.

Johanna Plendl

Aus der Abteilung für Nuklearbiologie der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung mbH München
Leiter: Prof. Dr. H. Kriegel

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. E. Dahme

Die spezifische Darstellbarkeit von Blutgefäßen der
NMRI-Maus während der Organogenese
mit Dolichos biflorus-Agglutinin.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Johanna Plendl
aus
Kirchroth

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

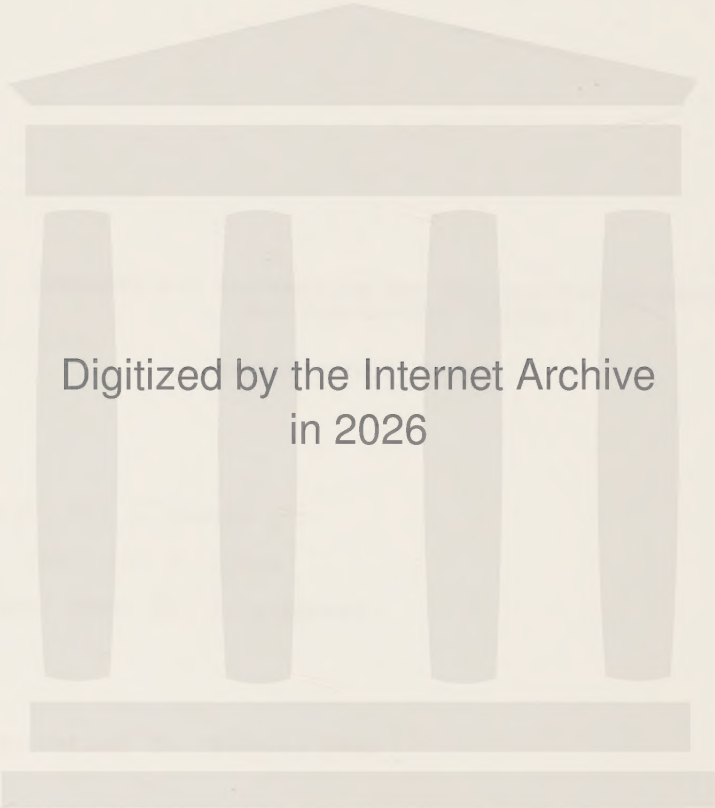
Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. E. Dahme

Korreferent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

Meiner lieben Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0042

INHALTSVERZEICHNIS

1. PROBLEMSTELLUNG
2. EINLEITUNG
 - 2.1. ZNS
 - 2.1.1. Allgemeine Entwicklung
 - 2.1.2. Bildung des Gehirns
 - 2.1.3. Bildung des Rückenmarks
 - 2.1.4. Bildung der Hirn-Rückenmarks-Hüllen
 - 2.1.5. Zytodifferenzierung und Schichtenbildung im embryonalen ZNS
 - 2.2. Blutgefäßsystem
 - 2.2.1. Allgemeine Entwicklung
 - 2.2.2. Blutgefäßsystem des embryonalen ZNS
 - 2.2.3. Darstellungsmöglichkeiten des Blutgefäßsystems
 - 2.3. Lektine
 - 2.3.1. Entdeckung und Vorkommen
 - 2.3.2. Definition
 - 2.3.3. Molekulare Eigenschaften
 - 2.3.4. Spezifität
 - 2.3.5. Genuine Funktion
 - 2.3.6. Toxizität
 - 2.3.7. Klassifizierung und Nomenklatur
 - 2.3.8. Funktion und Bedeutung in der Zellbiologie
 - 2.3.8.1. Interaktion Lektin-Zelle
 - 2.3.8.2. Einsatzbereich von Lektinen
 - 2.3.9. Anwendungsmethoden

1. PROBLEMSTELLUNG

In jüngster Zeit haben Lektine als sehr spezifische Kohlenhydratliganden Eingang in die medizinische und histologische Forschung gefunden, insbesondere im Bereich der Histochemie. Der Anwendung von Lektinen bei embryologischen Fragestellungen kommt dabei eine ganz besondere Bedeutung zu, nachdem bekannt ist, daß alle Entwicklungsprozesse der Gewebe von teilweise sehr schnellen und markanten Änderungen der Zelloberflächenstrukturen begleitet werden. Solchen dynamischen Veränderungen schreibt man heute nicht nur eine Schlüsselrolle bei Induktionsvorgängen zu, sondern sie sind auch wesentlich bei allen Adhäsionsvorgängen zwischen den einzelnen Zellen bei der histogenetischen Ausbildung zu definitiven Organ- und Gewebestrukturen beteiligt.

Ein Organsystem, das in besonderer Weise das Studium organogenetischer Prozesse ermöglicht, ist das Zentralnervensystem von Wirbeltieren während seiner Hauptorganbildungsperiode. Hier kommt es nicht nur innerhalb kürzester Zeit zu einer enormen Massen- und Volumenzunahme, sondern ebenso zu ganz speziellen Wanderungen einer großen Anzahl von Zellen, welche zur Etablierung der sehr differenzierten Schichten führt. Bis heute ist lediglich bekannt, daß bei solchen Migrationsvorgängen, die sehr spezifisch prädestiniert sind, sogenannte Leitbahnen eine Rolle spielen dürften. Hier scheint das Blutgefäßsystem, das gerade in der Hauptmigrationsperiode in das Zentralnervensystem einzusprossen beginnt, eine wichtige Funktion zu übernehmen. Das Studium solcher Zusammenhänge zwischen neuronaler ZNS-Entwicklung und Blutgefäßsystem gestaltete sich bisher sehr schwierig, da einerseits Ausguß- und Supravitalmethoden nicht aussagekräftig sind, andererseits bei der Anwendung elektronenmikroskopischer Methoden eine gleichzeitige Anfertigung von Übersichtspräparaten nicht möglich ist. Daraus entstand die in dieser vorliegenden

Arbeit behandelte Fragestellung nach einer zuverlässigen und auch für den Paraffinschnitt praktikablen Darstellung des embryonalen Gefäßsystems mit Hilfe von Lektin-Peroxidase-Konjugaten. Gleichzeitig ist mit einer solchen histochemischen Methode die Hoffnung verbunden, Ergebnisse über eventuelle phasenabhängige Variationen des Glykoproteinmusters sowohl der Neuroblasten bzw. Neuronen als auch der Gefäßzellen zu erhalten. Aus diesem Grund kamen zahlreiche Lektine mit unterschiedlichem Erfolg zum Einsatz. Nachdem jedoch die Anwendung von Dolichos biflorus-Agglutinin zu hervorragenden Ergebnissen führte, war es naheliegend - auch aus Gründen der Übersichtlichkeit - das Thema der vorliegenden Arbeit einzig auf diese Befunde abzustimmen. Ein besonderer Gesichtspunkt, nämlich der, einer möglichen praktischen Anwendung in der teratologischen Forschung, konnte ebenfalls nicht in der vorliegenden Dissertation behandelt werden. Dies ergab sich letztlich aus der Notwendigkeit, zuerst eine sehr gründliche Basis für solche weiterreichenden Aspekte zu schaffen, indem die normale Entwicklung intensiv charakterisiert werden mußte. Dadurch eröffneten sich nun durch vorliegende Arbeit wesentliche, neue Gesichtspunkte für das Studium der Pathogenese histologischer ZNS-anomalien und deren Beziehung zum Blutgefäßsystem.

2. E I N L E I T U N G

2.1. Zentralnervensystem (ZNS)

2.1.1. Allgemeine Entwicklung

Die primäre Anlage des ZNS, das sich vor allen anderen Organen entwickelt und differenziert, entsteht aus dem Ektoderm. Mesodermaler Herkunft sind nur die Hüllen des ZNS und der peripheren Nerven und Ganglien, sowie die ins Nervengewebe einsprossenden Gefäße (73, 94).

Am 7.5 Tag post conceptionem (d.p.c. = dies post conceptionem) bildet sich bei der Maus auf der Dorsalseite des Embryos, im Bereich der Mittellinie, eine Platte aus verdicktem Ektoderm. Diese Neuralplatte, nach cranial und lateral deutlich abgesetzt, caudal an den Primitivstreifen angrenzend, zeigt bereits zu diesem Zeitpunkt eine flache, V-förmige Einsenkung (Neuralrinne), deren seitliche Ränder sich am 8. d.p.c. aufrichten und so die Neuralwülste bilden. Im weiteren Verlauf des 8. Tages und am 9. d.p.c. werden die Neuralwülste zunehmend stärker ausgeprägt, bis sie sich in der Mittellinie treffen und zum Neuralrohr verschmelzen (53, 115, 145). Dieser Vorgang beginnt in der cervikalen Region des Embryos und setzt sich sowohl in rostrale als auch caudale Gebiete fort (49). Die vorübergehenden Verbindungen des Neuralrohrlumens mit der Amnionhöhle, der Neuroporus anterior bzw. posterior, schließen sich. Dies erfolgt beim vorderen Porus am 9. d.p.c., beim Neuroporus posterior am 10. d.p.c. (115).

Im Verlauf der Embryogenese kommt es durch Zellteilungs-, -differenzierungs- und -migrationsvorgänge zu einer Umgestaltung und Gliederung des ursprünglichen Anlageplans des Neuralrohrs. Dieser ist im spinalen Teil, der röhrenförmig bleibt, auch noch beim adulten Organismus zu erkennen, während der des cephalen Abschnittes durch mannigfaltige Umgestaltung und phylogenetisch neuere strukturelle Angliederungen erheblichen Veränderungen

unterworfen ist.

2.1.2. Bildung des Gehirns

Schon am frühen 9. d.p.c. weist der cephalé Teil des Neuralrohrs drei Erweiterungen auf. Diese Gehirnbläschen werden von cranial nach caudal als Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Rautenhirn) bezeichnet. Rostral der sich aus dem Prosencephalon im Verlauf des 9. d.p.c. vorwölbenden Augenbläschen, entstehen die zwei Hemisphärenbläschen, die sich durch einen Sulcus abgrenzen. Dadurch wird das ursprüngliche Vorderhirn in das Telencephalon (Endhirn) und das sich caudal anschließende Diencephalon (Zwischenhirn) unterteilt. Während sich das Mesencephalon zwar vergrößert, aber ansonsten einheitlich bleibt, gliedert sich mit dem Auftreten der Kleinhirnanlage am 9. d.p.c. das Rautenhirn in das Metencephalon (Nachhirn) und das caudal gelegene Myelencephalon (Markhirn), welches sich ohne feste Grenze ins Rückenmark fortsetzt.

Die grundlegende Gliederung des cephalen Nervensystems zeichnet sich somit bei der Maus am 10. d.p.c. ab. Mit dem 5-blasigen Stadium ist der Grundriß des fertigen Gehirns endgültig festgelegt. Die Bläschen bleiben zeitlebens als Gehirnventrikel erhalten und stehen mit dem Zentralkanal des Rückenmarks in direkter Verbindung (13, 73, 115, 145). Obwohl durch ungleichmäßiges Wachstum einzelner Wandabschnitte in Verbindung mit Zellverlagerungen und regional unterschiedlichen Zellansammlungen, der ursprüngliche, im Rückenmark noch weitgehend beibehaltene Anlageplan, entsprechend modifiziert wird, lassen sich trotzdem an manchen Gehirnabschnitten noch eine Reihe vergleichbarer morphologischer Strukturen erkennen. Als Beispiel sei der Sulcus limitans angeführt, der im Rückenmark die Grenze zwischen Flügel- und Grundplatte

bildet, und der durch das Myel-, Met-, Mes-, bis ins Diencephalon verfolgbar ist. Hier bildet er als Sulcus hypothalamicus die Grenzlinie zwischen motorischen und sensiblen Arealen (94).

In der folgenden Tabelle (nach 115) sind die wichtigsten Entwicklungsabschnitte des Gehirns zusammengefaßt:

Tabelle 1 (Diese Tabelle berücksichtigt nicht die stammspezifische Varianz von maximal +/- 0,5 Tagen)

ORGANANLAGE	ENTSTEHUNGSBEGINN BEI DER MAUS (d.p.c.)
Prosencephalon	8
Mesencephalon	8
Rhombencephalon	8
Scheitelbeuge	8
Nackenbeuge	11
Telencephalon	9
Hemisphärenbläschen	9
Lamina terminalis	10
Diencephalon	9
Augenbläschen	9
Epiphyse	12
Infundibulum	9
Plexus choroideus ant.	14
Rathkesche Tasche	9
Mesencephalon	
Hirnschenkel	13
Aquaeductus Sylvius	11
Vierhügelplatte	11
Metencephalon	
Pons	9
Cerebellum	9
Myelencephalon	9
Tela choroidea	10

2.1.3. Bildung des Rückenmarks

Zwischen 10. und 11. d.p.c. tritt an der Innenwand des Neuralrohrs eine Längsfurche, die sogenannte Grenzfurche, Sulcus limitans, auf. Da zu diesem Zeitpunkt eine erhebliche Größenzunahme, insbesondere der dorsolateralen und dorsoventralen Regionen stattfindet, kommt es zu einer Unterteilung der Seitenwand des Neuralrohrs in die ventral gelegene Grundplatte und die dorsale Flügelplatte. Im Rückenmark entsprechen der Flügelplatte die sensiblen Areale des Hinterhorns, die Grundplatte dem motorischen Vorderhorn. Die Neuronen sind als "graue Substanz" schon in einem frühen Entwicklungsstadium schmetterlingsförmig angeordnet. Die in der Mittellinie gelegenen dünnen Wandabschnitte werden Deck- und Bodenplatte genannt und sind als Durchgangsgebiet für Nervenfasern Teil der "weißen Substanz".

Am 10. d.p.c. sind, insbesondere im Gliedmaßenbereich, ventrale Nervenwurzeln sichtbar, die mit sich entwickelnden peripheren Bahnen der Dorsalwurzeln Kontakt aufnehmen, um den Stamm der Spinalnerven zu bilden. Als eines der vielen Derivate der ektodermalen Neuralleiste, deren erste Anlage schon am 8. d.p.c. auftritt, enthalten die zwischen dem 10. und 11. d.p.c. auftretenden Spinalganglien die den Dorsalwurzeln zugeordneten Neuronen (94, 115, 141, 145).

2.1.4. Bildung der Hirn- und Rückenmarkshüllen

Gehirn und Rückenmark werden zunächst von einer einheitlichen Mesenchymhülle, der Meninx primitiva, umschlossen (79, 80). Sie besteht aus der äußeren Ektomeninx und der inneren Endomeninx.

Die Periostauskleidung des Wirbelkanals (Endorhachis) und die der Schädelhöhle (Endocranium) als auch die eigentliche derbe Bindegewebshülle des ZNS (Pachymeninx,

Dura mater), sind Derivate der Ektomeninx. Aus der Endomeninx entwickelt sich die weiche Hirn- und Rückenmarkshaut (Leptomeninx), welche durch Spaltbildungen in die Spinnwebenhaut (Arachnoidea) und die zarte Hirn- und Rückenmarkshaut (Pia mater) unterteilt wird. Arachnoidea und Pia mater entwickeln sich nach dem Schluß des Neuralrohrs, zwischen dem 10. und 13. d.p.c. . Sie stehen untereinander in Verbindung und da zwischen ihnen die Gefäße aufgehängt sind, spielen sie eine maßgebliche Rolle bei der Vaskularisation des ZNS (94). Als Besonderheit in diesem Zusammenhang sei auf die Bildung des Plexus choroideus als Differenzierungsform eines Adergeflechtes der Pia mater hingewiesen (115).

2.1.5. Zytodifferenzierung und Schichtenbildung im embryonalen ZNS

2.1.5.1. Terminologie

Die Terminologie dieses Abschnitts entspricht den Empfehlungen des Boulder Committee (18). Folgende Übersicht zeigt die sonstigen, in der Literatur ebenfalls verwendeten Termini:

Ventrikulärzone (VZ)

Matrix (68)
Germinalzone (62)
Ependymale Schicht,
Neuroepithel (18)

Subventrikuläre Zone (SZ)

Subependymale Zone (62)

Intermediäre Zone (IZ)

Mantelzone (68)
Migrations-, Mantel-, Differenzierungs-, Zwischenzone (13)

Marginalzone (MZ)

Randschleier (68)

2.1.5.2. Die Schichten des embryonalen ZNS

Die zelluläre Entwicklung des ZNS führt zur Bildung vier fundamentaler Schichten, von denen sich die ausgereiften Strukturen ableiten lassen (18). Bis zum 10. d.p.c. besteht das Neuralrohr der Maus ausschließlich aus den pseudogeschichteten, hochprismatischen Epithelzellen der VZ (141). Sie gelten als Vorläufer sämtlicher Neuronen und der gesamten Makroglia des ZNS (18, 34, 46, 68). Eine Unterscheidung in prospektive Neuro- und Glioblasten ist lichtmikroskopisch nicht möglich (122). Zum genannten Zeitpunkt tritt bei der Maus, anfangs nur schmal und ventrolateral gelegen, die MZ auf (134, 141). Als anukleäre Schicht besteht sie aus den äußersten zytoplasmatischen Fortsätzen der VZ. Sie verbreitert sich im Laufe der Entwicklung, da nicht nur die Zellen der VZ eine bemerkenswerte mitotische Aktivität zeigen, sondern auch Elemente der nachfolgend beschriebenen IZ und SZ an ihrem Aufbau beteiligt sind (18). Später entspricht sie der sog. "weißen Substanz" (134). Im Grenzbereich VZ zur MZ entsteht zwischen dem 11. und 12. d.p.c. als Produkt sich teilender und nach außen abwandernder Zellen der VZ, die IZ (141). Ihre unreifen Neuronen entsenden Axone, die sowohl Kontakt untereinander, als auch mit Zellen der MZ aufnehmen (18). Als Vorläufer der "grauen Substanz" ist sie sowohl an der Bildung des Vorderhorns des Rückenmarks, als auch an der komplexen Struktur der Kortexplatte beteiligt (13, 128). Von der ursprünglichen VZ, zwischen ihr und der IZ gelegen, ist schließlich am 16. d.p.c. die SZ abzugrenzen (104). Während man vor einigen Jahren noch der Meinung war, daß sie im gesamten embryonalen ZNS vertreten ist (13), gilt sie nunmehr als ausschließliche Besonderheit des Gehirns (134). Sie spielt eine wichtige Rolle in der Histogenese des Cortex und behält ihre weitere Differenzierungsfähigkeit auch post natum.

2.1.5.3. Zeitliche und regionale Besonderheiten der Differenzierung

Als Vorläufer aller zellulären Elemente des ZNS zeigen die Zellen der VZ eine hohe mitotische Aktivität. Die Zytoplasmafortsätze dieser Zellen, die, als Charakteristikum des pseudogeschichteten Epithels, bipolar sowohl zur apikalen als auch basalen Oberfläche dieser Schicht reichen, werden bei Eintritt in die Mitose zurückgezogen. Die Zelle kugelt sich ab und teilt sich, der jeweiligen Region entsprechend, direkt am Lumen des Neuralrohrs oder in mehr oder minder lumennahen Lagen der VZ. Die Tochterzellen nehmen, nachdem sie sich wieder in periphere Lagen der VZ zurückgezogen haben, die ursprüngliche Form an (46, 129, 130, 131, 132). Als vorübergehende histogenetische Struktur ist die VZ kontinuierlichen Veränderungen unterworfen. Sie wird schmaler, bzw. verschwindet schließlich in dem Maße, wie sich ihre Zellen differenzieren.

Dieser als "Matrixanstieg" und "Matrixaufbrauch" bekannte Vorgang vollzieht sich in den einzelnen Teilen des Nervensystems in unterschiedlichen und für die Region charakteristischen Zeitabschnitten. Schon Spatz (137) und Kahle (68) machen darauf aufmerksam, daß diese Vorgänge einen Maßstab für die chronologische Aufeinanderfolge von Reifungsschritten des ZNS darstellen:

Am frühesten vollziehen sich der "Anstieg" und anschließende "Aufbrauch" der Matrix im Bereich des Rückenmarks. Dann folgen die einzelnen Abschnitte des Hirnstamms bis zum Diencephalon. In erheblichem zeitlicher Abstand zu letzterem setzen sie im Endhirn ein ("telencephale Retardierung"). Die Entwicklung des ZNS nimmt somit einen caudorostralen Verlauf.

Aber auch innerhalb einzelner Teile des ZNS bestehen gesetzmäßige, zeitliche und lokale Gradienten der Differenzierungsvorgänge. So eilt die Entwicklung der Grundplatte derjenigen der Flügelplatte voraus, sowohl was die Bildung und Differenzierung als auch das Verschwinden

der Zellen der VZ betrifft. Auch wenn im telencephalen Bereich eine Gliederung in Grundplatten- und Flügelplattenanteile nicht vorgenommen werden kann, so ist auch hier ein Reifungsunterschied zwischen den ventralen (z.B. Ganglienhügel) und den dorsalen Abschnitten (Pallium) zu bemerken, wobei letztere wiederum ihre Entwicklung nach den ventralen Zonen beenden (68).

Neuere Untersuchungen (48, 108, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 188) bestätigen die grundlegenden Erkenntnisse von Kahle (68) und berichten insbesondere über die regionalen Unterschiede der Differenzierung in einzelnen Abschnitten des ZNS.

2.2. Blutgefäßsystem

2.2.1. Allgemeine Entwicklung

Dem metabolischen Bedarf des schnell wachsenden Embryos entsprechend, beginnt die Entwicklung des Blutgefäßsystems der Maus am 7.5. d.p.c. (115, 145). Es kommt nicht, wie ursprünglich angenommen, zu einer zentripetalen Migration extraembryonaler Gefäße in den Embryo, sondern zur Entstehung von zwei, vorerst voneinander unabhängigen Teilen des Kreislaufapparates in situ, dem extra- und dem intraembryonalen Gefäßsystem. Erst im Verlauf der Embryogenese findet die Vereinigung und Ausbildung des einheitlichen Systems statt (73, 152). Das extraembryonale Gefäßsystem der Maus entwickelt sich aus den sog. "Blutinseln" in der mesodermalen Schicht des Dottersacks, wobei deren peripher gelegene Zellen zu Angioblasten, mithin zum späteren Endothel, die zentralen Zellen zu Erythroblasten werden (57, 152). Durch Aussprossung, Verlängerung und Differenzierung entsteht ein Kapillarnetz, aus welchem unter dem Einfluß hämodynamischer Faktoren schließlich am 8.5 bis 9. d.p.c. die Dottergefäße hervorgehen (8, 145). Auch innerhalb des Embryos findet die Entwicklung des Blutgefäßsystems im Mesoderm statt, beginnt jedoch ca. 0.5 bis 1 Tag später. Als hufeisenförmige, am vorderen Ende des 8 Tage alten Embryos gelegene Mesodermverdickung, entwickelt sich die Herzplatte, um nach dem Stadium des paarigen Endokardschlauches schon am späten 8. d.p.c. als tubuläres Organ erste Kontraktionen zu zeigen (145). Die übrigen Blutgefäße, die sich an verschiedenen Stellen des Körpers in situ differenzieren, nehmen Verbindung mit der Herzanlage auf und schließlich entsteht am 9. d.p.c. die Kommunikation des extra- mit dem intraembryonalen Kreislauf (115).

In der folgenden Tabelle (115) sind die großen Gefäße des Embryos ihrem zeitlichen Auftreten gemäß zusammengefaßt:

Tabelle 2 (115)

(A. = Arteria, Aa. = Arteriae, V. = Vena, Vv. = Venae)

GEFÄSS	ENTSTEHUNGSBEGINN BEI DER MAUS (d.p.c.)
Aorta descendens	8
Aortenbogen I	8.5
Aortenbogen II	9
Aortenbogen III	11
Aortenbogen IV	10
Aortenbogen V	10.5
Aortenbogen VI	10.5
Aortenbogen VII	11
Aorta ascendens	8
A. carotis interna	8.5
Aa. intersegmentales	11
Aa. intercostales	11
A. iliaca	11
A. umbilialis	11
A. omphalomes.	8
A. caudalis	9
A. basilaris	9
A. pulmonalis	13
A. cereбрalis	9
Vv. cardinales craniales	9
Vv. cardinales caudales	11
Vv. hepaticae	11
Vv. pulmonales	7
V. umbilicalis	9
V. cava cranialis	12
V. cava caudalis	10

2.2.2. Blutgefäßsystem des embryonalen ZNS

Die arterielle Versorgung des Rückenmarks erfolgt durch die Aa. vertebrales, die aus der Aorta descendens entspringen und die segmentalen Aa. spinales abgeben. Die Venen haben im wesentlichen den gleichen Verlauf wie die Arterien und werden daher auch entsprechend benannt.

Der arterielle Zustrom des Gehirns erfolgt einerseits über die aus den Aa. vertebrales entlassene A. basalis (Hirnstamm, Kleinhirn, caudaler Neocortex), andererseits über die A. carotis interna (Zwischenhirn, mittlerer und vorderer Cortex). Beide Systeme sind über Rami communicantes miteinander verbunden. Ausgehend von diesem Hauptversorgungssystem wird das Gehirn von einem Netz leptomeningealer Arterien überzogen, von denen aus Äste ins Gehirn eintreten.

Der venöse Abfluß erfolgt über ein extradural gelegenes Venensystem, wobei deren Verlauf in keinem Zusammenhang zu den Arterien steht (13, 94).

Die Vaskularisation des ZNS erfolgt während der Organogenese in zwei Phasen (87). Während der ersten Phase, der externen Vaskularisation, ca. am 9. bis 10. d.p.c., entsteht ein Gefäßnetz an der Oberfläche der Gehirnbläschen und des übrigen Neuralrohrs, der sog. perineurale Plexus (140). Von ihm leitet sich das leptomeningeale System ab (141).

Mit Beginn der zweiten Phase, der internen Vaskularisation, die bis in die postpartale Zeit reicht, dringen, ausgehend vom perineuralen Plexus, Gefäßsprossen ins Parenchym des ZNS kurz nach Neuralrohrschluß ein (9, 21, 71). Diese stellen zu Beginn noch relativ weiträumige Gefäßsinus dar und geben an die verschiedenen Schichten weitgehend rechtwinklige Seitenäste ab (8, 21). Nach Erreichen der VZ kommt es hier zu einer starken Verzweigung der Stammgefäße, wodurch ein sog. primärer subventrikulärer Stammplexus gebildet wird (137).

Bei der Entstehung der Vaskularisierung des ZNS eilt

offenbar die arterielle Zufuhr der Entwicklung eines Venensystems voraus (35), wobei auch in den späteren Embryonalstadien kein eindeutiger morphologischer Unterschied zwischen arteriellen und venösen Gefäßen zu erkennen ist (1, 21). Die Endothelien selbst früher Gefäßsprossen bedürfen offensichtlich nur mehr geringer morphologischer Reifungsprozesse, um die Charakteristika der endgültigen Gefäßendothelien des Gehirns anzunehmen (80). Lediglich die enge Apposition und Zusammenfügung des Endothelsystems mit den Perizyten und den Gliakontakten, unterliegt wesentlichen Reifungsprozessen bis zur Etablierung einer funktionsfähigen Blut-Gehirnschranke in der Perinatalzeit (139). Diese Entwicklung bedingt notwendigerweise die stetige Veränderung der zellulären Zusammensetzung der Kapillaren während der Prä- und Perinatalperiode (9).

2.2.3. Darstellungsmöglichkeiten des Blutgefäßsystems

Abgesehen von der Kautschuk- oder Kunststoffinjektion zur makroskopisch-anatomischen Beurteilung, bieten sich für mikroskopische Zwecke, je nach Fragestellung, eine Vielzahl von Methoden zur Darstellung von Blutgefäßen an. Lichtmikroskopisch wird das Gefäßsystem durch Injektion mit Tusche o.ä., Kapillaren, Präkapillaren und kleinere Gefäße, bzw. Gewebskomponenten größerer Gefäße, durch eine Reihe von Spezialanfärbungen sichtbar gemacht (24, 110). Außerdem ist es möglich, Gefäße durch Anfärbung ihres Inhalts, beispielsweise der Erythrozyten mit Diaminobenzidin, zu identifizieren (30). Die Fluoreszenzmikroskopie bedient sich meist der FITC-Dextran-Mikroangiographie (96), in der Elektronenmikroskopie wird in der Regel immersionsfixiertes und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiertes Material untersucht (117). Neuere Methoden der Gefäßdarstellung berücksichtigen

jedoch nicht nur morphologische Kriterien, sondern auch biochemische Unterschiede zwischen Gefäßen und umgebendem Gewebe; dies betrifft vor allem die Endothelien. Insbesondere bei Studien über Entzündung und Gefäßregeneration, Tumervaskularisation und Embryogenese wurden Techniken entwickelt, die eine selektive Darstellung des Blutgefäßsystems, abhängig von Herkunft, Entwicklungszustand und eventuellen pathologischen Veränderungen zulassen. Dazu gehören u.a. die Feststellung von im vaskulären Endothel lokalisierten "factor-VIII-related-antigen" mit Hilfe einer Immunperoxidase-Methode (87), weiterhin auch der Nachweis eines aus der Kuhmilch isolierten Glycoproteins in Kapillarendothelien (55), die Markierung des in Endothelien lokalisierten "angiotensin-converting-enzym" mit monoklonalen Antikörpern (3) und die Darstellung von Gefäßen mit LEKTINEN (17, 65, 83, 103).

2.3. Lektine

2.3.1. Entdeckung und Vorkommen

Als im Jahre 1888 Stillmark (125) aus dem Samen des Wunderbaums, *Ricinus communis*, ein toxisches Extrakt isolierte, welches gleichzeitig auch Erythrozyten agglutinierte, begann die Ära der Lektinologie.

Wegen ihrer Erythrozyten-agglutinierenden Eigenschaft und ihrem bis dahin nur in Pflanzen bekannten Vorkommen, wurden sie anfangs als Hämagglutinine, Phyttagglutinine oder Phytohamagglutinine bezeichnet. Lektine kommen jedoch nicht nur in Pflanzen vor und dort außer im Samen auch in den übrigen vegetativen Teilen, sondern auch in Bakterien, Invertebraten und Vertebraten (52, 70, 123, 125).

Nachdem noch ein weiteres Charakteristikum der Lektine, nämlich ihre spezifische Affinität zu bestimmten Zuckerstrukturen bekannt geworden war, gab ihnen Boyd im Jahre 1949 den Namen Lektine (lat.: *leggere* = auswählen) (125).

2.3.2. Definition

Aufgrund des derzeitigen Kenntnisstandes werden Lektine definiert als kohlenhydratspezifische, zuckerbindende Proteine oder Glycoproteine, die tierische und pflanzliche Zellen agglutinieren und / oder Polysaccharide, Glycoproteine und Glycolipide präzipitieren, dabei aber keine verwandtschaftliche Beziehung zu Antikörpern oder Immunglobulinen besitzen. Sie können im jeweiligen Organismus gelöst (Bsp.: Con A) oder membrangebunden (Bsp.: Rattenleberagglutinin) vorkommen und haben eine oder mehrere (16), nach anderen Angaben mindestens zwei Bindungsstellen für Zucker (47, 51).

2.3.3. Molekulare Eigenschaften

Versucht man, die molekularen Eigenschaften der Lektine, die diese Gruppe als Ganzes charakterisiert, zusammenzufassen, so wird man feststellen, daß es sich um eine recht heterogene Reihe von Proteinen bzw. Glycoproteinen handelt, die ein generelles Strukturprinzip, wie es etwa bei Immunglobulinen anzutreffen ist, vermissen lassen. Das Molekulargewicht schwankt zwischen 26.000 (WGA) und 400.000 (LBA) (123). Die polymere Struktur, verantwortlich für die Fähigkeit zur Agglutination und Präzipitation, ist Folge von nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten, deren Anzahl je nach Lektin erheblich variiert (70), z.B. zwei Einheiten bei WGA, sechs bei HPA, achtzehn bei LPA (77). Häufig vorkommende Aminosäuren sind Asparaginsäure, Serin und Threonin. Schwefelhaltige Aminosäuren kommen selten vor, können jedoch dann bis zu 20 % am Gesamtaminosäurenanteil (WGA) beteiligt sein (77). Während bestimmte Lektine, wie Con A, WGA und PNA nur Proteine und keine Kohlenhydratanteile enthalten, kann bei Glycoproteinen, wie z.B. potato-agglutinin, 55% des Moleküls aus Kohlenhydraten bestehen, wobei kovalent gebundene Mannose, Galactose und Glucosamine, zum geringen Teil auch Xylose und Arabinose, gefunden werden. Einen weiteren, als wahrscheinlich obligat für die Kohlenhydratbindung erachteten Bestandteil, stellen Metallionen dar, meist Mn^{2+} oder Ca^{2+} (123). Von einem Großteil der Lektine existieren sog. Isolektine, die sich bei gleicher Kohlenhydratspezifität und ähnlicher aber nicht identischer Struktur, vor allem in ihren elektrophoretischen Eigenschaften unterscheiden (22, 95, 123).

2.3.4. Spezifität

Die Kenntnis der Kohlenhydratspezifität der Lektine basiert auf der Landsteiner-Hapten-Inhibitionstechnik (50), einer Methode, die als kompetitive Antagonisten des Lektins bei der Zellagglutination oder Glycopräzipitation einfache Kohlenhydrate oder Glycoside einsetzt.

Obwohl diese Methode sicher zu Recht als unangemessen vereinfachend für eine Typisierung kritisiert wird, gelang es doch weitgehend, die Kohlenhydratspezifität und die Grundzüge der Bindung zwischen Kohlenhydrat und Lektin zu charakterisieren.

Die nicht-kovalente und daher reversible Bindung des Lektins findet mit einigen Ausnahmen an der nicht-reduzierenden, terminalen Glycosylgruppe von Kohlenhydraten, bzw. Glycoproteinen statt (22, 50, 125). Con A und eine Reihe anderer Lektine dagegen können auch, bzw. nur, Kohlenhydrate innerhalb einer Kette von Oligosacchariden binden (50, 146).

Einige Lektine zeigen nahezu ausschließliche Affinität zu Mannose oder Glucose, andere dagegen zu Galactose.

Obwohl manche Lektine nicht zwischen α - und β -Anomeren unterscheiden, zeigen andere wiederum nur zu einem der Anomere Affinität, wobei teilweise sogar eine ganz bestimmte Sequenz der gebundenen Kohlenhydrate Voraussetzung ist (148).

Wie komplex die Anforderungen eines Lektins an "seine" Kohlenhydratstruktur sind, zeigt, daß zwei verschiedene Lektine, z.B. DBA und SBA, zwar dieselbe Zuckerspezifität haben können, trotzdem aber bei identischen Versuchen keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt werden konnten (28). Die Ursache solcher Abweichungen liegt anscheinend darin, daß für die Bindung eines Lektins nicht nur die endständige Kohlenhydratgruppe des Rezeptors, sondern seine gesamte Tertiärstruktur ausschlaggebend ist (100).

2.3.5. Genuine Funktion

Über die eigentliche Funktion der Lektine im pflanzlichen oder tierischen Herkunftsorganismus, ist trotz intensiver Forschung noch sehr wenig bekannt. Spekulationen hinsichtlich ihrer physiologischen Rolle bei Pflanzen reichen von der Annahme, daß Lektine einen Schutzmechanismus gegenüber pathogenen Mikroorganismen darstellen, bis hin zu der Vermutung, sie stünden im Zusammenhang mit der Symbiose mit Wurzelbakterien (6, 113). Bei Bakterien und Viren wird u.a. eine Teilnahme beim Anhaften an die Zelloberfläche des Wirtsorganismus diskutiert (52). Bei manchen Invertebraten glaubt man, daß deren Lektine eine Vorläuferfunktion für Immunglobuline besitzen (70). Bei Vertebraten werden sie sowohl als mögliche Regulatoren des Glycoprotein-Stoffwechsels (6, 52, 146), als auch als Mediatoren der Phagozytose (127) angesehen.

2.3.6. Toxizität

Mit der Entdeckung des ersten Lektins, dem eingangs erwähnten Ricin, wurde zugleich auch dessen Toxizität erkannt. Seine Wirkung beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese eukaryotischer Zellen (113). Von den derzeit bekannten Lektinen sind die meisten zytotoxisch, ja manche zeigen sogar das Phänomen selektiver Zytotoxizität gegenüber transformierten Zellen (22).

2.3.7. Klassifizierung und Nomenklatur

Die Klassifizierung der Lektine erfolgt nach ihrer Kohlenhydratspezifität, wobei sieben große Gruppen unterschieden werden (113, 52):

Spezifität für	Beispiel
1. D-Mannose oder D-Glucose	Con A
2. N-Acetyl-D-Glucosamin	WGA
3. N-Acetyl-D-Galactosamin	DBA, HPA, LBA, SBA
4. D-Galactose	MPA, PNA, RCA
5. L-Fucose	UEA
6. Sialinsäure	LFA, LPA
7. Komplexe Kohlenhydrate	PHA

Bei der Nomenklatur der Lektine wird ihre Herkunft, d.h. ihre biologische Quelle, berücksichtigt, wobei i.d.R. der lateinische Name gebraucht, die allgemein gebräuchliche Abkürzung aber häufig aus dem Englischen übernommen wird.

Tabelle 3 (nach 52 und 148): Herkunft, Nomenklatur und Spezifität einiger Lektine

<u>BENENNUNG (ABKÜRZUNG)</u> <u>UND HERKUNFT</u>	<u>SPEZIFITÄT</u>
Arachis hypogaea (PNA) Erdnuß (engl. peanut)	D-Gal- β -(1-3)-GalNAc
Canavalia ensiformis (Con A) Schwertbohne	α -D-Glc, α -D-Man
Dolichos biflorus (DBA) Dicke Bohne	α -D-GalNAc, D-Gal
Glycine max (SBA) Sojabohne	α -D-GalNAc, D-Gal
Helix pomatia (HPA) Weinbergschnecke	α -D-GalNAc
Limax flavus (LFA) Wegschnecke	Sialinsäure
Limulus polyphemus (LPA) Pfeilschwanzkrebs	Sialinsäure
Maclura pomifera (MPA) Maulbeerbaumgewächs	α -D-Gal
Phaseolus limensis (LBA) Limabohne	α -D-GalNAc
Phaseolus vulgaris (PHA) Gartenbohne	D-GalNAc
Ricinus communis (RCA) Rizinussamen	β -D-Gal, D-GalNAc

Tritium vulgaris (WGA)	β -(1-4)-D-GlcNAC
Weizenkeim (engl. wheatgerm)	
Ulex europaeus (UEA)	α -L-Fucose
Stechginstersamen	

2.3.8. Funktion und Bedeutung der Lektine in der Zellbiologie

Der breite Einsatzbereich der Lektine umfaßt so verschiedene Gebiete wie Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie, Toxikologie, Onkologie, Immunologie etc. . Dies verdanken sie vor allem ihrer einfachen Verfügbarkeit: es werden heute von verschiedenen Laboratorien eine breite Palette hochgereinigter Lektine angeboten, die durch konventionelle Methoden, wie Gelfiltration, Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie, gewonnen werden (22, 148).

2.3.8.1. Interaktion Lektin-Zelle

Kohlenhydrate sind ein wichtiger Bestandteil aller Zellen, insbesondere der Zelloberfläche als auch der assoziierten intra- und extrazellulären Membranstrukturen (95). Nach der heute allgemein akzeptierten Vorstellung des "fluid mosaic membrane model" (154), besteht die Matrix jedes Plasmalemmas aus Glycolipiden und -proteinen, über deren Oberfläche Kohlenhydratmoleküle ragen. Diese Kohlenhydratmoleküle sind zwar nur zu 2 bis 10 % am Aufbau von Membran- und Rezeptormolekülen beteiligt (124), besitzen jedoch eine Schlüsselrolle sowohl bei physiologischen Vorgängen, wie Zellwachstum, Differenzierung und Gewebsbildung als auch bei pathologischen Prozessen, wie Virusinfektion und

vermutlich auch bei der malignen Transformation (126). Daß sich diese Rezeptorstrukturen je nach Spezies, Gewebsart, physiologischer und pathologischer Situation der Zelle unterscheiden und dabei auch kontinuierlichen Veränderungen unterliegen, wurde vor allem durch die Anwendung der Lektine in Biologie und Medizin nachgewiesen.

Eine Bindung von Lektinen an membranständige Kohlenhydratstrukturen kann in gewissen Fällen einen biologischen Effekt auslösen. Die einfachste Form einer derartigen Interaktion ist die Agglutination von Zellen durch Lektine. Das Lektin bewirkt dabei durch seine Bindung - als vereinfachende Vorstellung des eigentlich komplexen Vorgangs - eine vielfältige Brückenbildung zwischen entsprechenden Zellen (124).

Als biologische Folge einer solchen Bindung kann durch bestimmte Lektine aber auch eine Rezeptorenstimulation mit nachfolgender Proliferation von Zellen, ebenso auch eine Rezeptorenblockade, eingeleitet werden (146).

Die Mechanismen der Stimulation bzw. der Hemmung von Rezeptoren sind trotz umfangreicher Forschungen noch nicht geklärt (113).

2.3.8.2. Einsatzbereich von Lektinen

Auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie werden Lektine eingesetzt, um die Zelloberflächenveränderung während der Gametenreifung, Befruchtung und Embryogenese zu bestimmen (98). Die Beobachtung, daß während Wachstum und Differenzierung embryonaler Zellpopulationen die Bindung bestimmter Lektine je nach Entwicklungsstadium variiert, weist auf entsprechende Änderungen der Anzahl, Lokalisation, Verteilung oder Mobilität bestimmter Rezeptoren hin.

Der eigentliche Grund und die biologische Bedeutung dieser steigenden oder fallenden Bindungsaffinität ist nur

teilweise geklärt, z.B. im Fall einer sterischen Blockade oder Maskierung von Rezeptoren durch Neuraminsäure oder anderen sialinsäurehaltigen Strukturen (78, 92, 109, 119, 120).

Ähnliche Unterschiede der Affinität der Lektine für normale und neoplastisch transformierte Zellen sind ebenfalls beschrieben worden. Während beispielsweise Fibroblasten verschiedener Spezies oder Hepatomzellen von Ratten schon bei minimalen Konzentrationen durch bestimmte Lektine agglutinieren, ist dies bei den entsprechend unveränderten Zellen erst bei sehr hohen Konzentrationen möglich (22). Obwohl unbestritten ist, daß entartete Zellen Veränderungen ihrer Zelloberfläche, mithin also auch deren Kohlenhydratmoleküle, besitzen (113), gibt es nur für wenige, bis jetzt untersuchte Zelllinien eine strenge positive Korrelation zwischen ihrer Malignität und der durch Lektine hervorgerufenen Agglutination (22, 95, 125, 146). Es existieren ebenso Beispiele für die "Ausnahme von der Regel", nämlich, daß normale Zellen agglutinieren, die malignen Abkömmlinge dagegen nicht (22, 113). Trotzdem haben bestimmte Lektine bereits Eingang in die Diagnostik von tumorösen Erkrankungen gefunden, z.B. verwendet man PNA zur Erkennung von Hodgkin-Zellen (86).

Wie bereits erwähnt, können Lektine über ihre Bindung an Plasmamembranen auch biologische Effekte auslösen. Einer der am bekanntesten ist dabei die Auslösung des Wachstums und der Proliferation von Lymphozyten. Bestimmte Lektine, wie etwa z.B. UEA I, verursachen eine Mitogenese sowohl von T- als auch B-Lymphozyten, andere, wie Con A, nur von T-Lymphozyten (22, 77, 95, 106).

Mit solchen proliferationsstimulierenden Wirkungen von Lektinen, bietet sich ein Modell für das Studium der Lymphoblastengenese (148), des Zellzyklus (22), immunologischer Phänomene (125), von Chromosomenaberrationen (125) u.a. .

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Eigenschaften nehmen Lektine noch in vielen anderen Bereichen eine besondere Stellung ein. So dienen sie z.B. in der Hämatologie zur

Typisierung von Blutgruppen und Blutuntergruppen (126), in der Mikrobiologie zur Differenzierung pathogener von apathogenen Bakterienstämmen (33), in der Radiologie zur Erkennung von Zelloberflächenveränderung nach Bestrahlung (72), sowie in der Parasitologie zur Erforschung von Entwicklungsstadien von Parasiten (101).

2.3.9. Anwendungsmethoden

Eine Vielzahl von Methoden erlaubt es, die Interaktion eines Lektins mit der Zelle, sichtbar zu machen.

Außer im einfachsten Fall, der Agglutinationsreaktion, deren Ergebniss ohne weitere Hilfsmittel auswertbar ist, werden Lektine beim indirekten qualitativen oder quantitativen Nachweis mit einem Tracer oder Marker konjugiert, der dann lokalisiert werden kann. Beispiele dafür sind die Ankopplung von Radioisotopen (Radiojod, -nickel, -helium) (113), Schwermetallverbindungen wie Ferritin oder Gold (27, 114), sowie die Biotin-Lektin-Konjugate. Letztere dienen zum sensitiven histochemischen Nachweis der Lektin-Affinitäten mit Hilfe einer Biotin-Avidin-Reaktion (148).

Weiterhin werden, insbesondere zur Reinigung von Zuckern, Hormonen oder Enzymen, basierend auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie, sog. "immobilisierte Lektine" verwendet, d.h. die Lektine sind zu diesem Zweck an Polymere, wie z.B. Dextran, Sephadex o.ä. gebunden.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Versuchstiere

Mäuseembryonen der Stämme NMRI, CBA, C57Bl6 und Balb/c der GSF, Neuherberg, vom 7. bis 13 d.p.c. wurden untersucht. Die Muttertiere erhielten Altromin-Preßfutter und Wasser ad libitum. Ihre Haltung erfolgte in Makrolonkäfigen (27/21/15 cm) in vollklimatisierten Räumen bei einer Temperatur von 23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 85% und unter künstlicher Beleuchtung von 6 bis 18 Uhr.

Zur Paarung wurden acht Wochen alte, virginelle Weibchen zwischen 8 und 10 Uhr zu dritt mit jeweils einem gleichaltrigen Männchen zusammengesetzt. Die belegten Weibchen wurden durch Kontrolle auf den Vaginalpfropf ermittelt. Der auf die Paarung folgende Tag gilt als 1. Tag post conceptionem (d.p.c.).

Pro Untersuchungstag wurden 3 Muttertiere zwischen 10 und 12 Uhr durch Genickbruch getötet und je 3 bis 5 Embryonen zur Untersuchung verwendet.

3.2. Präparation und Herstellung der histologischen Schnitte

Sofort nach Entnahme wurden die Uteri mit den Embryonen auf Korkplatten gespannt und in Formalin (1:4) zwei bis sechs Wochen lang fixiert.

Da nach verschiedenen Hinweisen in der Literatur (115) und auch nach eigener Erfahrung die Trennung der Embryonen vom Uterus erst ab dem 9. d.p.c. möglich ist, wurden am 7. und 8. d.p.c. Uterus und Embryo in toto zur Untersuchung verwendet. Ab dem 9. d.p.c. gelang die Präparation des Embryos aus dem Uterus.

Da die zunehmende embryonale Krümmung um die Längsachse

exakte Querschnitte verschiedener Regionen verhindert hätte, wurde ab dem 10. d.p.c. eine Vierteilung des Embryos vor der Einbettung in Paraffin vorgenommen. Gemäß der Empfehlung von M. A. Derby (persönliche Mitteilung), brachte man die einzelnen Embryonen dazu in eine Petrischale mit Hank's balanced salt solution (Sigma) und teilte sie unter der Lupe mit dem Mikroskalpell in folgende vier Abschnitte:

1. Abschnitt: Kopf bis 1. Somitenpaar (excl.)
 2. Abschnitt: 1. Somitenpaar bis zum Schultergürtel incl. Vordergliedmaßen
 3. Abschnitt: Thorax und Abdomen
 4. Abschnitt: Beckengürtel, Hintergliedmaßen und Schwanz
- Die so erhaltenen Präparate wurden wegen ihrer geringen Größe im folgenden in Einbettkörbchen (Shandon) verbracht.

Die Entfernung des Formols aus dem fixierten Gewebe ("Auswaschen") erfolgte durch Einlegen in 20% Chloralhydratlösung. Anschließend wurde durch eine Übertragung in eine Alkoholreihe steigender Konzentration entwässert. Der Entfernung des absoluten Alkohols ("Entspriten") mit Benzol, folgte die Durchtränkung der Präparate im Wärmeofen mit reinem Paraffin. Dann bettete man sie mit Hilfe einer Lupe in Paraffin ein.

Von den eingebetteten Objekten wurde mit dem Mikrotom (Leitz, 1512) Serienschritte von 7 μ Dicke angefertigt, die mit der Eiweißwassermethode (Eiweißglycerin und aqua dest.) auf Objektträger aufgeklebt wurden. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine Alkoholreihe fallender Konzentration in PBS übertragen.

3.3. Lektin - Konjugat

Dolichos biflorus - Agglutinin (DBA), konjugiert mit Peroxidase vom Meerrettich (engl. = horseradish, Abk. HR).

HRP, wurde bezogen von Medac GmbH, Hamburg, als Lösung (1 mg in 0.1 M PBS), als auch von Sigma, Taufkirchen, als Pulver. Letzteres wurde in PBS (Sigma, 1 mg/1 ml) gelöst. In beiden Fällen war 1 mg Lektin mit 1 mg HRP gekoppelt.

D B A

Das Lektin wird gewonnen aus *Dolichos biflorus* ("Dicke Bohne", Ordnung Leguminosae, Hülsenfrüchtler, Familie Papilionaceae, Schmetterlingsblütler). Es handelt sich um ein membranständiges Lektin, mit einem Molekulargewicht von ca. 110.000, das, als Tetramer, aus je zwei Untereinheiten gebildet ist und in zwei isolektinen Formen vorkommt. Der Proteinanteil besteht weitgehend aus Asparaginsäure und Serin. Schwefelhaltige Aminosäuren kommen nicht vor. Im Kohlenhydratanteil sind 2% Hexose vertreten. Die Bindung erfolgt an terminales, nicht-reduzierendes, α -gebundenes N-acetyl-galactosamin (GalNAc) (40, 41, 150).

3.4. Inkubation der histologischen Schnitte mit dem Lektin und anschließende Färbung

Zur Blockade der Aktivität intrinsischer Peroxidase, tauchte man die Präparate zuerst für ca. 10 Minuten in PBS - 0.2% H₂O₂. Nach mehrmaligem Waschen in PBS, erfolgte die 30-minütige Inkubation mit HRP - DBA in einer Verdünnung von 0.02 mg/ml in PBS bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer. Abhängig von der Größe des Präparats wurden 1 oder mehrere Tropfen der Lektin-Lösung aufgebracht. Nach der Inkubation wurde gründlich in PBS ausgewaschen. Zur Lokalisierung der gebundenen Peroxidase wurden die Präparate für 10 Minuten in eine Lösung aus 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) mit Trispuffer (50 mg/100 ml) überführt, danach mit Trispuffer ausgewaschen. Zur abschließenden Gegenfärbung wählte man Hämalaun (1 bis 2 Minuten) mit anschließendem Differenzieren in H₂O.

Bevor die Objektträger mit Eukitt eingeschlossen wurden, entwässerte man sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe und entfernte schließlich den Alkohol mit Xylol.

3.4.1. Erklärung der cytochemischen Reaktion

HRP - Konjugate gehen auf die Methode von Bernhard und Avrameas (12) zurück.

Das Glycoprotein HRP besetzt eine Kohlenhydratbindungsstelle des Lektins, und dieses, so markiert, kann mit seiner weiteren freien Bindungskapazität Kontakt zur Zelloberfläche aufnehmen. Nachgewiesen, d.h. lichtmikroskopisch sichtbar, wird schließlich ein braunes Farbpigment, das sich mit Hilfe des Enzyms HRP aus DBA (farblos) bildet (95, 113, 124).

3.5. Vorbehandlung mit Neuraminidase

Um eine eventuell mögliche enzymatische Demaskierung von DBA-Rezeptoren zu überprüfen, wurden eine Reihe ausgewählter Präparate mit Neuraminidase von Clostridium perfringens (Sigma Typ X; 0.1 unit/ml) 18 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die Inkubation mit DBA und anschließende Färbung erfolgte in der bereits beschriebenen Weise.

3.6. Haptenzucker und Kontrollfärbung

D - N - acetylgalactosamin (Gal NAc), Produkt von Sigma, diente als Zusatz zum Inkubationsmedium zur Überprüfung der kompetitiven Hemmbarkeit der DBA-Peroxidase-Affinitätsreaktion.

Es wurden einige Präparate mit DBA-HRP inkubiert, dem 0.2

M Gal NAc zugesetzt worden war. Alle übrigen Schritte entsprachen denen des experimentellen Färbegangs.

3.7. Beurteilung der Schnitte

Es wurden mit einem Lichtmikroskop (Leitz Optovar) untersucht:

Vom 7., 8. und 9. d.p.c.:	je 10 Objektträger
Vom 10., 11., 12. und 13. d.p.c.:	15 bis 20 Objektträger des Abschnittes 1 und je 5 Objektträger der Abschnitte 2, 3, 4.

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit dem Fotomikroskop (Wild, M 400).

4. E R G E B N I S S E

4.1. Allgemeines histologisches DBA- Affinitätsmuster der NMRI-Maus während der Organogenese (7. bis 13. d. p.c.)

Schon ab dem 8. d.p.c., zu einem Zeitpunkt also, an dem sich die ersten intraembryonalen Gefäße etablierten, wies deren Endothel eine starke Affinität zum HRP-konjugierten DBA auf. Auch an allen anderen folgenden Untersuchungstagen war die hohe DBA-Affinität der Endothelzellen ein sehr markanter Befund. Besonders fielen dabei die starke DBA-Affinität großer Gefäße, wie Aorta, Aortenbogengefäße und A. carotis interna, aber auch reich vaskularisierter Gebiete, wie Mandibularbogen, Gliedmaßenknospen, Genitalleiste oder der Bereich zwischen den Somiten ins Auge. Obwohl sich das Endothel großer Venen, wie z.B. der Vv. cardinales, meist nicht so intensiv anfärbte, wie das der Arterien, war jedoch keine grundsätzliche Unterscheidung der beiden Gefäßarten möglich.

Vor der Entstehung des Blutgefäßsystems, am 7. d.p.c., zeigte lediglich das viscerale Endoderm, insbesondere im anukleären Bereich seiner Zellen, eine starke Anfärbbarkeit. Das parietale Endoderm und das eben auftretende Mesoderm waren DBA-negativ.

Ab dem 8. d.p.c. zeigte sich der Darm als DBA-positiv. Der apikale Teil seiner Zellen war am 8. d.p.c. schwach, am 9. und 10. d.p.c. stark DBA-positiv, am 11. d.p.c. schließlich schwand die Anfärbbarkeit.

Als extraembryonale, DBA-positive Gewebe, waren am 8. d.p.c. die viscerale Schicht des Dottersacks stark, das Amnion schwach anfärbbar. Ab dem 9. d.p.c. bis zum 13. d.p.c. zeigte das Amnion eine besonders intensive Färbung nach der HRP-Reaktion.

Die folgenden Ausführungen sind auf die Gefäße des sich entwickelnden ZNS beschränkt.

4.2. Spezielles histologisches DBA-Affinitätsmuster des ZNS der NMRI-Maus

4.2.1. 8. d.p.c.

An diesem Entwicklungstag existierten im Zellverband der VZ noch keine Gefäße. Das Endothel der großen Gefäße (Aorta, A. carotis interna), von denen Äste zur Versorgung des ZNS abzweigen, waren ebenso intensiv anfärbbar, wie das der vielen kleinen Gefäße im perineuralen Mesenchym der Gehirnanlage und des übrigen Neuralrohrs.

Besonders auffällig war jedoch, daß in Regionen mit noch unvollständigem Schluß der Neuralwülste zum Neuralrohr, die Endothelien der dort benachbarten Gefäße keine Anfärbbarkeit zeigten.

4.2.2. 9.d.p.c.

Die Gefäßendothelien des nunmehr vollständig ausgebildeten perineuralen Plexus, zeigten eine starke DBA-Affinität. Die von diesem Plexus ausgehenden Gefäßäste dagegen, welche in das Parenchym des ZNS einsproßten, waren dort DBA-negativ.

Ausschließlich im spinalen Teil des Neuralrohrs waren vereinzelte und kurze Abschnitte des Gefäßsprossenendothels beim Eintritt ins Parenchym mit HRP-DBA darstellbar. Dieses Muster war außerdem unregelmäßig ausgeprägt.

Schwach DBA-positiv reagierten einige wenige Gefäßendothelien im Bereich des Plexus choroideus.

Besonders auffällig zeigten sich die intensiv anfärbbaren Gefäße in der Nachbarschaft der Augenbläschen.

4.2.3. 10. d.p.c.

Zum ersten Mal waren Endothelien intraneuraler Gefäße DBA-positiv. Ausgehend vom nach der HRP-Reaktion intensiv angefärbten Endothel des perineuralen Plexus, zeigte das Endothel seiner Sprossen innerhalb der VZ des Rückenmarks und des Myelencephalon starke, im Diencephalon schwache und im Mes- und Metencephalon sehr schwache DBA-Bindung. Besondere Bedeutung verdient die Tatsache, daß insbesondere im Myelencephalon, teils auch im Neuralrohr, neben stark positiven Gefäßendothelien auch solche vorlagen, die nur blaß, bzw. gar nicht anfärbbar waren. Sämtliche Gefäßendothelien des Telencephalon besaßen zu diesem Zeitpunkt noch keine DBA-Bindungsstellen. In den Spinalganglien reagierten die Gefäßendothelien des periganglionären Bereichs stark, die des intraganglionären Bereichs nur schwach positiv. Von den Ganglien (Ggl.) der Gehirnnerven fiel das Ggl. V auf, dessen Gefäßendothelien lediglich peri- jedoch nicht intraganglionär schwach anfärbbar waren. Diejenigen des Ggl. VIII dagegen zeigten sowohl peri- als auch intraganglionär eine schwache DBA-Bindung. Im Gegensatz zum 9. d.p.c. wiesen die Gefäßendothelien des Plexus choroideus nunmehr intensive Anfärbbarkeit auf. Die Befunde an den Augen entsprachen denen des 9. d.p.c. . Als besonders auffällig erwiesen sich schließlich noch die Gefäße in und um die Ohranlage, welche konstant DBA-negativ waren.

4.2.4. 11. d.p.c.

Im Zuge der Zytodifferenzierung zeichnete sich nunmehr die Schichtung des ZNS, insbesondere in dessen spinalen Anteil und im Myelencephalon deutlich ab. In den genannten Bereichen fanden sich, abgesehen vom positiven perineuralen Gefäßendothel, neben DBA-positiven Endothelien

der VZ, auch solche in der IZ.

Dabei war insbesondere im spinalen Teil des Rückenmarks ein deutlicher caudo-rostraler Gradient festzustellen: in caudalen Bereichen fiel die Färbung weniger intensiv und weniger leuchtend aus, als in cranialen Bereichen des Neuralrohrs. Dieser Gradient war an allen nachfolgenden Untersuchungstagen vorhanden.

In den übrigen Teilen des ZNS, in denen die Schichtung noch nicht eindeutig ausgebildet war, fanden sich zum ersten Mal auch im Telencephalon DBA-positive Gefäßendothelien innerhalb der VZ. Hier waren es insbesondere Gefäße der rostralen, bzw. rostrolateralen Wand und solche im Bereich der Basalganglien, die eine starke DBA-Affinität zeigten.

Im Bereich des Mes- und Metencephalon fiel auf, daß die Endothelien von Gefäßen des Grundplattenanteils intensiver anfärbbar waren als solche des Flügelplattenanteils.

Auch im Diencephalon zeigten sich regionale Unterschiede in der Anfärbbarkeit. Die Gefäßendothelien im hypo- und subthalamischen Bereich reagierten schwach, solche im Thalamus vereinzelt sogar stark positiv.

Besonders auffällig waren die Gefäße, die durch die Marginalzone des gesamten ZNS zogen: ihre Endothelien zeigten weder zu diesem Zeitpunkt noch später eine DBA-Affinität.

Von den Gehirnganglien waren im Gegensatz zum 10. d.p.c. die periganglionären Gefäßendothelien des Ggl. VIII deutlich positiv. Auf histologischen Schnitten, welche das Ggl. X zur Darstellung brachten, waren sowohl peri- als auch intraganglionär schwach positive Gefäßendothelien sichtbar.

Die Befunde an den Spinalganglien, dem Plexus choroideus und den Augen entsprachen denen des vorhergehenden Untersuchungstages. Auch innerhalb des Linsenblaschens zeigten sich jetzt DBA-positive Gefäße.

4.2.5. 12.d.p.c.

Im gesamten ZNS, mit Ausnahme des Telencephalon, nahm die DBA-Affinität perineuraler Gefäßendothelien deutlich ab. Die Befunde innerhalb des Zellverbandes des Rückenmarks entsprachen denen des 11. d.p.c., d.h. die Gefäßendothelien der VZ reagierten stark positiv, diejenigen der IZ positiv.

Auch der caudo-rostrale Gradient bezüglich der DBA-Peroxidase-Reaktion von Gefäßen war weiterhin deutlich erhalten.

Die Befunde in der VZ des Myelencephalon glichen denen des vorhergehenden Untersuchungstages, die Endothelien von Gefäßen der IZ reagierten dagegen nur noch ausnahmsweise schwach positiv.

Im Mes- und Metencephalon waren, wie am 11. d.p.c., die Gefäße des Grundplattenanteils intensiver angefärbt als solche des Flügelplattenanteils.

Die DBA-Bindung von Gefäßendothelien der VZ des Diencephalon wurde deutlich geringer als am 11. d.p.c. .

Es traten jetzt aber schwach positive Gefäßendothelien in der IZ auf. Im Gegensatz zum 11. d.p.c. waren insbesondere Gefäße des hypothalamischen Bereichs intensiv anfärbbar.

In der VZ des Telencephalon zeigten die Gefäßendothelien alle Intensitätsabstufungen der Anfärbbarkeit, d.h., es lagen neben schwach positiven auch positiv und stark positiv reagierende Gefäße vor. In der IZ war das Endothel nur weniger Gefäße blaß angefärbt.

Weiterhin zeichneten sich die perineuralen Gefäßendothelien des Telencephalon, im Gegensatz zu denen anderer Teile des ZNS, durch eine hohe DBA-Affinität aus. Die intraganglionären Gefäßendothelien der Spinalganglien zeigten eine intensivere Lektinbindung als an den vorhergehenden Untersuchungstagen.

Sowohl die peri- als auch die intraganglionären Gefäßendothelien des Ggl. V waren im Gegensatz zum 10.

d.p.c. intensiv anfärbbar. Anschnitte des Ggl. VIII wiesen seine periganglionären Gefäße als negativ, die intraganglionären als schwach positiv aus. Die Befunde am Plexus choroideus und an den Augen entsprachen denen vom 11. d.p.c. .

4.2.6. 13. d.p.c.

Der auffallendste Befund dieses Untersuchungstages bestand in einer sehr deutlichen Abnahme der Lektin-Bindung von Gefäßendothelien der VZ und IZ des Rückenmarks. Nur noch vereinzelt waren in Gefäßendothelien der VZ cranialer Bereiche schwache Farbschatten erkennbar. Die Mehrheit der Gefäße der VZ und der gesamten IZ blieben in der Peroxidase-Reaktion ungefärbt.

Auch die Endothelien der perineuralen Gefäße zeigten nur noch schwache DBA-Affinität.

Im Myelencephalon waren sowohl im peri- als auch intraneuralen Bereich nur noch wenige Gefäßendothelien, vor allem des Grundplattenanteils, blaß angefärbt.

Die Endothelien der Gefäße der VZ des Mes- und Metencephalon waren dagegen, insbesondere im Grundplattenanteil, noch schwach DBA-positiv.

Das Endothel der perineuralen Gefäße des Myel- ebenso wie des Diencephalon war intensiver anfärbbar als am 12. d.p.c. .

Die großen Schwankungen in der Anfärbbarkeit von Gefäßen des Telencephalon waren nicht mehr feststellbar. Sie wiesen alle eine deutlich positive DBA-Affinität auf.

Die Lektin-Bindung der perineuralen Gefäße des Telencephalon war im Vergleich zum vorhergehenden Untersuchungstag weniger intensiv.

Das Endothel periganglionärer Gefäße der Spinalganglien zeigte, ähnlich wie am 12. d.p.c., positive, das der intraganglionären Gefäße jetzt sogar stark positive Reaktion.

Die DBA-Affinität im Bereich des Ggl. V entsprach ebenfalls der des 12. d.p.c., die peri- als auch intraganglionären Gefäße des Ggl. VIII dagegen, hatten ihre DBA-Affinität verloren.

Die Befunde an Plexus choroideus und den Augen entsprachen denen des 11.d.p.c. .

4.2.7. Zusammenfassung, tabellarische und graphische Übersicht

Das DBA-Bindungsmuster der Gefäßendothelien des ZNS der embryonalen NMRI-Maus zeigte deutliche zeitliche und regionale Unterschiede. Die auffälligsten Befunde der Färbung waren ausschließlich innerhalb der undifferenzierten VZ zu finden. Mit fortschreitender Zytodifferenzierung des ZNS nahm die DBA-Affinität der Gefäßendothelien ab.

Tabelle 4 und Graphik 1 veranschaulichen die genannten Ergebnisse vom 9. bis 13. d.p.c. .

Tabelle 4

Histologisches DBA-Affinitätsmuster der Gefäßendothelien
des ZNS der NMRI-Maus vom 9. bis 13. d.p.c.

+++ = sehr intensive Färbung nach der HRP-Reaktion

++ = intensive Färbung

+ = schwache Färbung

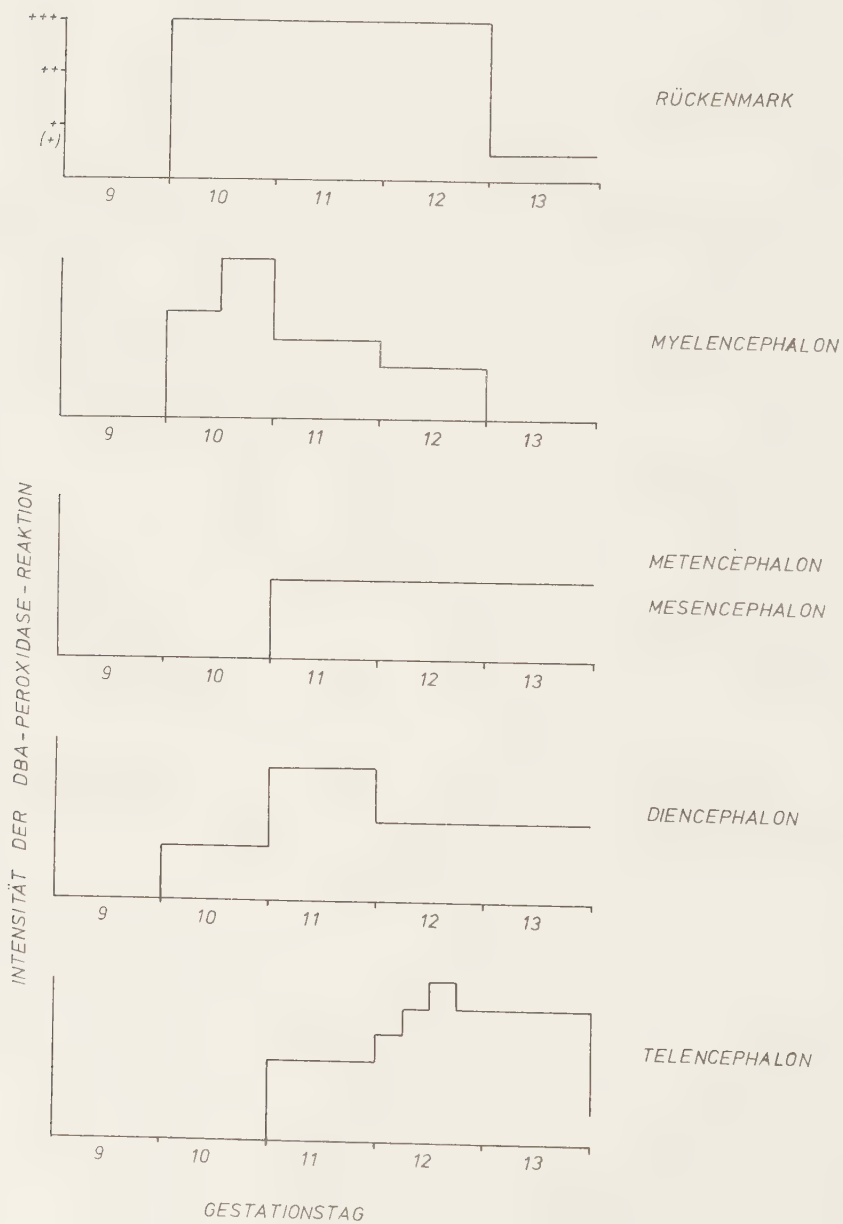
(+) = unregelmäßige und sehr schwache Färbung

kein Zeichen = Schichtung noch nicht erkennbar

	9.	10.	11.	12.	13.
<u>SPINALER TEIL DES</u>					
<u>NEURALROHRS</u>					
Ventrikulärzone	-	+++	+++	+++	(+)
Intermediärzone			++	++	-
Marginalzone			-	-	-
Perineur. Mesenchym	++	+++	+++	++	+
 <u>SPINALGANGLIEN</u>					
intraganglionär		+	+	++	+++
perigangl. Mesenchym		+++	+++	++	++

	9.	10.	11.	12.	13.
<u>CEPHALER TEIL DES NEURALROHRS</u>					
MYELENCEPHALON					
Ventrikulärzone		++	++	++	-
Intermediärzone			+	(+)	(+)
Marginalzone			-	-	-
Perineuales Mesenchym	++	+++	++	+	(+)
MET- UND MESENCEPHALON					
Ventrikulärzone	-	(+)	++	+	+
Intermediärzone			-	-	(+)
Marginalzone			-	-	-
Perineurales Mesenchym	+++	+++	+++	+	++
DIENCEPHALON					
Ventrikulärzone	-	+	++	+	+
Intermediärzone			-	+	+
Marginalzone			-	-	-
Perineurales Mesenchym	++	+++	+++	+	++
TELENCEPHALON					
Ventrikulärzone	-	-	++	+ / ++ / +++	++
Intermediärzone			-	(+)	++
Marginalzone			-	-	-
Perineurales Mesenchym	++	+++	+++	+++	++

GRAPHIK 1: DBA-AFFINITÄT DES GEFÄSSENDOTHELS
INNERHALB DER VENTRIKULÄRZONE



4.3. Histologisches DBA-Affinitätsmuster weiterer Mäusestämme (CBA, C57Bl6 und Balb/c) während der Organogenese

Die Ergebnisse am Blutgefäßsystem der NMRI-Maus während der Embryonalperiode waren bei Embryonen anderer Mäusestämme nicht zu erzielen.

Nur in einigen histologischen Präparaten der C57Bl6-Maus waren wenige, unregelmäßig angefärbte Stellen im Endothel der A. carotis zu sehen.

Als einzige Gemeinsamkeit bezüglich der histologischen DBA-Affinität der NMRI-Embryonen mit Embryonen vergleichbarer Stadien vom Stamm CBA, C57Bl6 bzw. Balb/c war lediglich die Anfärbbarkeit der visceralen Schicht des Dottersacks festzustellen.

Tabelle 5 gibt einen vergleichenden Überblick über das DBA-Affinitätsmuster der am 11. d.p.c. untersuchten Mäusestämme

Tabelle 5

Histologisches DBA-Affinitätsmuster embryonaler Gewebe
verschiedener Mäusestämme am 11. d.p.c.

	NMRI	CBA	C57Bl6	Balb/c
ECTODERM				
Epidermis	-	++	+++	+
Neuralrohr	-	-	-	-
MESODERM				
Undifferenz. Mesenchym	-	(+)	(+)	-
Knorpelanlage	-	-	-	(+)
Gefäßendothel	+++	-	x	-
Endokard	-	-	-	-
Nierenanlage	-	-	-	-
Lebersinusoid	+	-	-	(+)
ENTODERM				
Visc. Dottersack	+++	+++	++	+
Pharynx	-	-	-	-
Magen	-	-	-	-
Darm	-	++	-	-
Ductus hepaticus	-	++	++	(+)
Lungenknospen	-	-	-	-

x = unregelmäßige, fleckige Anfärbung ausschließlich der A.
carotis

4.4. Effekt der Vorbehandlung mit Neuraminidase

Durch die Vorbehandlung mit Neuraminidase wurden keine zusätzlichen DBA-Bindungsstellen induziert. Eine eventuelle sterische Blockade oder Maskierung von DBA-Rezeptoren durch Sialinsäure konnte so ausgeschlossen werden.

4.5. Kontrollreaktionen zur DBA-HRP-Histochemie

Die Spezifität der Reaktion wurde durch Zusatz von N-acetylgalactosamin zum Lektin-Inkubationsmedium bestätigt. Unter diesen Bedingungen war keines der Präparate in der Peroxidase-Reaktion anfärbbar.

4.6. Fotografische Dokumentation
NMRI-Maus, 7. bis 13. d.p.c.

Texte zu den Abbildungen 1 bis 16

Abb. 1

Embryo, 7. d.p.c.

Lokalisation der DBA-Rezeptoren im visceralen Endoderm, insbesondere im apikalen Teil der Zellen.

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 850

E = Ektoderm

VE = viscerales Endoderm

M = Mesoderm

Abb. 2

8. d.p.c.

Extraembryonale Blutinseln (BI) mit stark DBA-positiver visceraler Schicht des Dottersacks (D).

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 850

Abb. 3

8. d.p.c.

DBA-positive Gefäßendothelien (→) im perineuralen Mesenchym des Neuralrohrs (N) und der Gehirnanlage (G)

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 850

Abb. 4

9. d.p.c.

DBA-positive Gefäßendothelien (→) im Bereich des Neuralrohrs (N) und des Mandibularbogens (links außerhalb des Bildes).

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 560

Abb. 5

9. d.p.c.

Gefäße mit DBA-Affinität ($\rightarrow$) im perineuralen Mesenchym (M) des Myelencephalon (My), Ausschnitt des Ohrbläschens (O).

DBA-Peroxidase- Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 350

Abb. 6

10. d.p.c.

Hohe DBA-Affinität des Amnions (A), im Gegensatz zur geringen Affinität der extraembryonalen Blutinseln (BI).

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 1400

Abb. 7

10. d.p.c.

Ins Parenchym des Neuralrohrs (N) einziehende, stark DBA-positive Äste des perineuralen Plexus (P).

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 350

Abb. 8

10. d.p.c.

DBA-Rezeptoren an Gefäßendothelien ($\rightarrow$) der reich vaskularisierten Gliedmaßenknospe (GK).

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 350

Abb. 9

11. d.p.c.

Die in das Neuralrohr (N) einziehenden Gefäße ($\rightarrow$) zeigen hohe DBA-Affinität.

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 350

Abb. 10

12. d.p.c.

Wandausschnitt des Telencephalon, Ventrikularzone (VZ) und Marginalzone (MZ). Gefäße des perineuralen Plexus stark DBA-positiv ($\rightarrow\rightarrow$), diejenigen der VZ schwach positiv ($\rightarrow$).

DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 850

Abb. 11

12. d.p.c.

Intra- und periganglionäre, stark DBA-positive Gefäßendothelien ($\rightarrow$) im Bereich eines Spinalganglion. DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 850

Abb. 12

12. d.p.c.

Wandausschnitt des Rückenmarks mit Ventrikulärzone (VZ) und Marginalzone (MZ). Das perineurale Gefäß zeigt deutliche DBA-Affinität ; ab dem Eintritt in das Rückenmark nimmt diese ab ($\rightarrow$). DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 850

Abb. 13

12. d.p.c.

Starke DBA-Affinität des perineuralen Gefäßplexus ($\rightarrow\rightarrow$). Deutliche Affinität ($\rightarrow$) der Endothelien im Bereich der Ventrikulärzone (VZ) und Marginalzone (MZ). Dagegen im Bereich eines ausdifferenzierten Kerngebietes (K) keine DBA-Affinität feststellbar. DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 350

Abb. 14

13. d.p.c.

DBA-Rezeptoren an Gefäßendothelien ($\rightarrow$) im Bereich der Anlage von Pigmentepithel (P) und Glaskörper (G). Gebiet des Eintritts des Nervus opticus (N.o.). DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 350

Abb. 15

13. d.p.c.

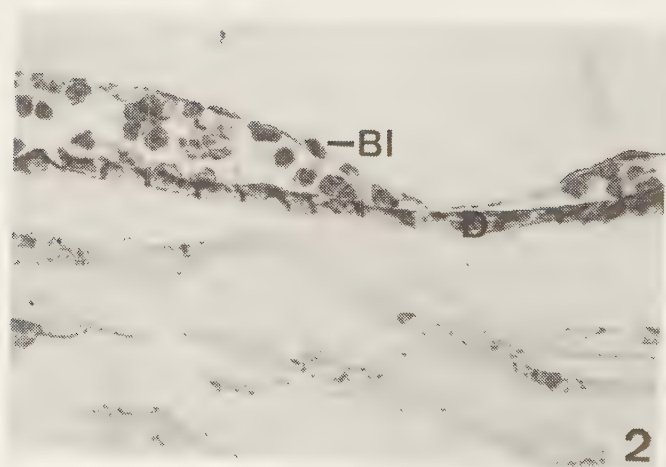
Perineurales Mesenchym mit Anschnitt des Ganglion V und VIII (G V, G VIII). Unterschiedliche DBA-Affinität der Gefäßendothelien dieser Ganglien. DBA-positive Gefäße ($\rightarrow$) nur in Ganglion V. DBA-Peroxidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 350

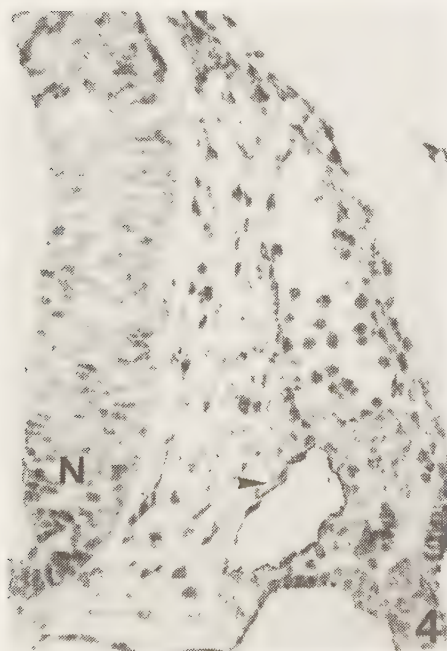
Abb. 16.

13. d.p.c.

Wand des Telencephalon mit Ventrikulärzone (VZ) und
Marginalzone (MZ).Gefäßendothelien (->) mit deutlicher
DBA-Affinität.

DBA-Peroidase-Reaktion, Gegenfärbung Hämalaun, x 850

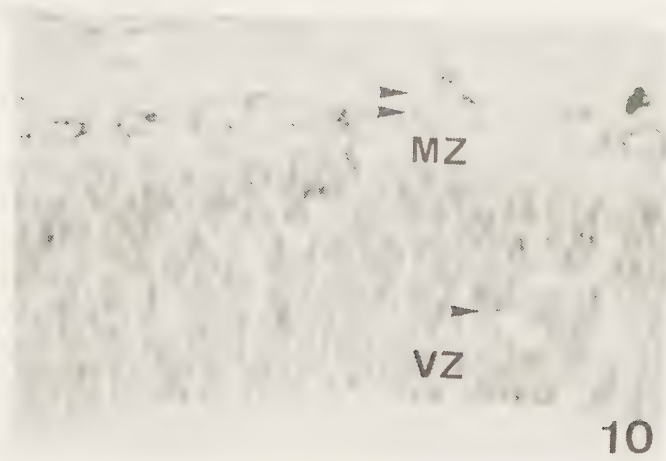


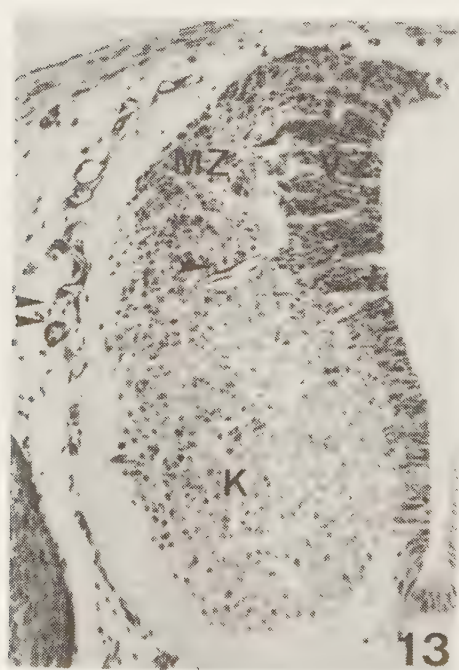
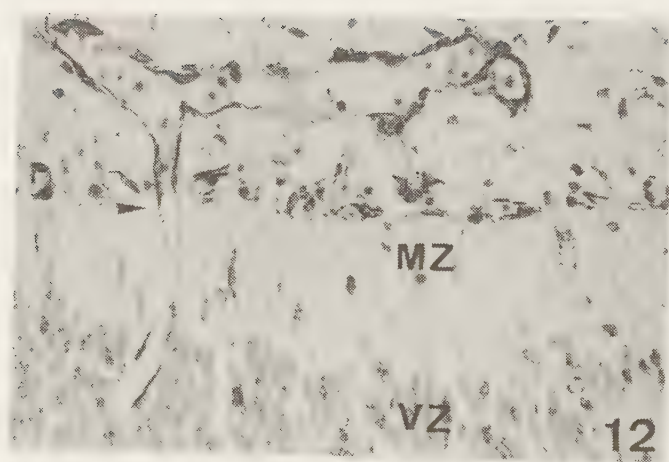


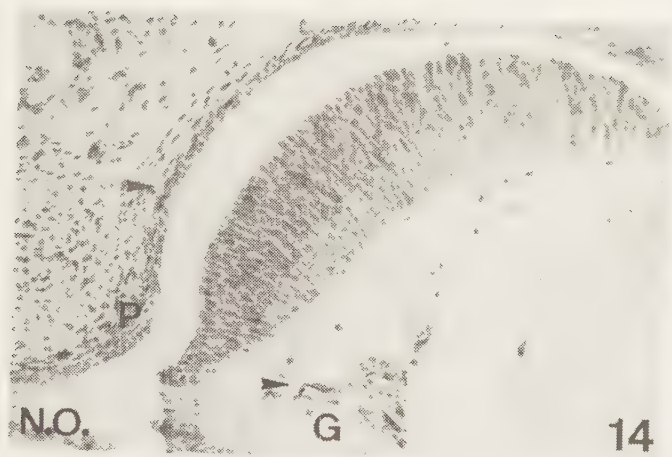


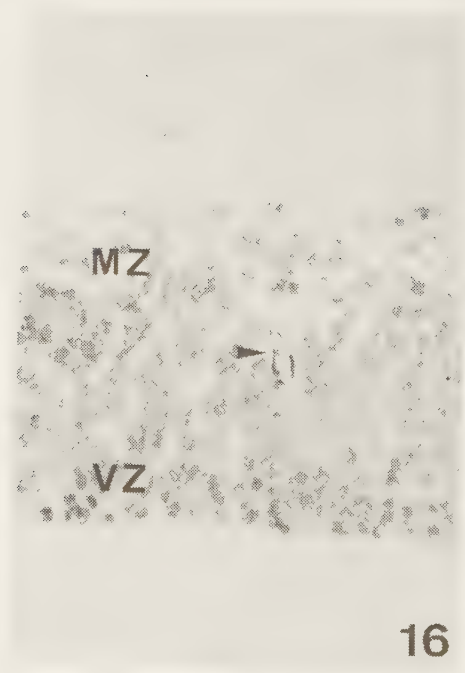












5. DISKUSSION

Das bedeutsamste Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die starke, regional und zeitlich variierende DBA-Affinität aller embryonalen Blutgefäßendothelien der NMRI-Maus während der Organogenese, sowie die Abnahme dieser Affinität im Zuge der Differenzierung.

Diese Befunde waren im Hinblick auf entsprechende Studien anderer Autoren, welche sich ebenfalls mit der Lektinaffinität embryonaler Gewebe beschäftigten, nicht zu erwarten. Noguchi (97) findet in seinen histologischen Untersuchungen an 129/Sv-SlCP- und C57Bl/10-Mäusen am 4.5 bis 12.5 d.p.c. zwar ebenfalls das viscerele Entoderm, Darm und visceralen Dottersack als DBA-positiv, beschreibt jedoch sowohl das Amnion als auch das Blutgefäßsystem als negativ. Auch van der Valk et al. (147) stellt bei Mäusen der Stämme GRS/A und SJL/JA am 13. und 16. d.p.c. keine histologische Bindung von DBA an Endothelien fest.

Im Gegensatz zu den genannten und auch zu meinen Untersuchungen stehen Berichte über die DBA-Affinität des Blutgefäßsystems adulter Mäuse.

Ponder et al. (103) beschreibt die organbezogene Anfärbbarkeit des Blutgefäßsystems adulter RJJJ/ro und DDK-Mäuse. Er findet Gefäßendothelien verschiedener Organe, wie z.B. Skelett, Muskulatur, Nerven, Gastrointestinaltrakt etc., als DBA-positiv, diejenigen anderer Gewebe, wie Gehirn, Lymphknoten, Lunge, etc. jedoch als DBA-negativ. Watanabe et al. (153) gelang die Anfärbung von Blutgefäßen des Gehirns adulter 129/slcp und Balb/c-Mäuse, allerdings nur mit der FITC-DBA-, nicht mit der HRP-Methode. Van der Valk (147) und eine Reihe weiterer Autoren (14) können die DBA-Affinität des Blutgefäßsystems adulter Mäuse wiederum nicht bestätigen.

Der genannte Unterschied zwischen meinen Ergebnissen und denen anderer Autoren, wirkt zwangsläufig die Frage nach

der methodischen Zuverlässigkeit der histologischen Darstellung vorhandener DBA-Rezeptoren in den vorliegenden Experimenten auf.

Grundsätzlich ist zu bemerken, daß stets bei Lektinaffinitätsstudien Diskrepanzen der Resultate verschiedener Autoren zu beobachten sind. Diese beruhen neben Spezies, physiologischer oder pathologischer Situation des untersuchten Gewebsmaterials auch auf folgenden Faktoren: Schwankungen in der Aktivität kommerzieller Lektine, unterschiedliche Konjugierung mit farbgebenden Molekülen, Beeinflussung durch die histologische Präparation, insbesondere Fixierung und Einbettung (108).

Nachdem bekannt geworden war, daß eine nicht unerhebliche Variation der Aktivität kommerzieller Lektin besteht (56), wurde schon 1982 der Vorschlag zur Gründung einer "International Working Party on Standardization of Lectins for Diagnosis" gemacht (15). Viele namhafte Anwender von Lektinen beklagen u.a. die Tatsache, daß sogar verschiedene Chargen eines Lektins vom gleichen Hersteller im Standardversuch unterschiedliche Ergebnisse bringen. Umfangreiche Testprogramme zur Erforschung dieses Phänomens sind zwar noch nicht abgeschlossen, lassen aber erkennen, daß die Ursache weder bei einem bestimmten Hersteller, einem bestimmten Lektin noch der jeweiligen Lektinreinigungsmethode zu suchen ist.

Das Problem der schwankenden Güte von Chargen trat auch im Verlauf der vorliegenden Arbeit auf. Trotz vorschriftsmäßiger Behandlung und Verwendung waren mit einer bestimmten Lektincharge keine befriedigenden Ergebnisse zu erzielen. Die folgenden Chargen desselben Herstellers zeigten dagegen wieder das gewohnte Bindungsmuster der vorhergehenden.

Obwohl die vorliegende Untersuchung ausschließlich mit Peroxidase-konjugiertem Lektin durchgeführt wurde, sei nochmal auf die Möglichkeit der Abweichung von Ergebnissen auf Grund der Verwendung verschiedener Lektinkonjugate verwiesen, wie sie Watanabe et al.

beschreibt (153). Die Ursache dafür wird in der mir zur Verfügung stehenden Literatur nicht erläutert. Es existieren aber auch Beispiele, die zeigen, daß unterschiedliche Lektinkonjugate (z.B. HRP- und Ferritinkonjugate) sehr wohl ein identisches Bindungsmuster zeigen können (142).

Bezüglich der Beeinflussung der Bindung eines Lektins durch Fixations- und Einbettungsmedium, liegen eine Vielzahl zum Teil auch gegensätzlicher Aussagen verschiedener Autoren vor: es gibt Hinweise, daß unbehandeltes Gewebe weniger reproduzierbare Resultate erzielt als fixiertes (74). Weiterhin ist bekannt, daß durch Aldehydfixation Lektinbindungsstellen provoziert werden, die in vivo nicht bestehen (76) bzw., daß formalinfixiertes Material nicht das gesamte Bindungsmuster widerspiegelt (122). Am Beispiel der Mäuseepidermis erwies sich die Formalinfixation sogar als gänzlich ungeeignet für eine folgende Lektinbindung (11). Schließlich verneinen andere Autoren einen Effekt von Fixation und Einbettung auf die Bindung eines Lektins (29, 75, 103).

Die vorliegende Untersuchung wurde ausschließlich an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebematerial durchgeführt. Das Resultat zeigt, daß es möglich ist, an den so behandelten Schnitten Lektinbindungsstellen darzustellen und bestätigt so die Aussagen der letztgenannten Autoren bezüglich der Durchführbarkeit der Reaktion und dem Fehlen der genannten Faktoren auf die Spezifität derselben. Auch bei wiederholten Färbedurchgängen mit Lektin verschiedener Hersteller und verschiedener Chargen, war das Ergebnis in allen Fällen (mit Ausnahme der einen, bereits erwähnten Charge) konstant reproduzierbar! Es trat weder unspezifische Hintergrundfärbung noch irgendeine Abweichung vom gefundenen Bindungsmuster auf.

Die vorliegenden Ergebnisse, welche eine herausragende Affinität von DBA zum Gefäßendothel aufzeigen, können also nicht in Analogie zu den oben erörterten methodischen

Aspekten, auf derartige Unregelmäßigkeiten zurückgeführt werden.

Schließlich wurde dieses Problem durch die Hinzuziehung von Embryonen weiterer Mäusestämme eindeutig gelöst. Es zeigte sich nämlich, daß die beschriebene DBA-Affinität des embryonalen Endothels ein ausschließliches Charakteristikum der NMRI-Maus ist und weder bei eigenen Untersuchungen noch denen anderer Autoren an Embryonen anderer Mäusestämme nachweisbar war. Die Darstellung des Blutgefäßsystems der NMRI-Maus an Hand von DBA, ist somit für diesen Tierstamm spezifisch.

Außer der hier vorgestellten Endotheldarstellung mit DBA sind in der Literatur noch andere Lektine mit spezifischer Affinität zum Blutgefäßsystem von Wirbeltieren und des Menschen bekannt. So gelang Holthöfer (65, 83) und Borisch et al. (17) die Markierung von Blutgefäßen sowohl im differenzierten als auch im tumorös entarteten menschlichen Gewebe mit UEA I. Diese Methode hat bereits Eingang in die Diagnostik von Neoplasien des Blutgefäßsystems gefunden. Gefäße der menschlichen Haut konnte Bell et al. (111) mit SBA darstellen. Über die Markierung von cerebralen Blutgefäßen der embryonalen Ratte mit WGA berichtet Brückner (23), diejenige neonataler Ratten mit RCA, SBA, MPA, Con A und WGA beschreibt Miyake (84). Mit RCA gelang es Raedler et al. (104), cerebrale Gefäße von Mäusen des Stammes Balb/c darzustellen und van der Valk et al. (146) findet Endothelien der Venen neonataler Balb/cHeA- und GRS/A-Mäuse als RCA-positiv.

Keiner der genannten Autoren diskutiert jedoch seine Ergebnisse im Vergleich mit anderen Mäuse- bzw. Rattenstämmen.

Die DBA-spezifischen Zelldeterminanten sind sowohl im Tierreich als auch beim Menschen weit verbreitet. Sie wurden beschrieben an Zellen der Gallengänge, des exokrinen Pankreas, der weißen Milzpulpa, des Nebenhodens (153), der Oozyten (32), der Magenschleimhaut (147), der

Retina (14), der Haut und Mundschleimhaut der Maus (107), auf Chromosomen von Spermatogonien (136), im Pankreas und in den Speicheldrüsen der Ratte (121), in der Retina (10) und Fibroblasten des Huhns (109) und an der Niere vieler Säugetiere (61, 66).

Obwohl diese Rezeptoren schon so häufig nachgewiesen wurden, ist ihre Struktur und vor allem ihre Funktion noch weitgehend unbekannt. Sicher ist, daß sich die Rezeptoren, wie in der Einleitung bereits näher ausgeführt, je nach Spezies, Gewebsart, physiologischer oder pathologischer Situation der Zelle unterscheiden, bzw. kontinuierlichen Veränderungen unterworfen sind.

Die Bindung von DBA findet an terminales, nicht-reduzierendes, α -gebundenes N-acetylgalactosamin statt. Aufgrund dieser Eigenschaft ist es mit DBA möglich, menschliche A-Erythrozyten zu agglutinieren und die Blutgruppensubstanz A zu präzipitieren (26). Die Blutgruppenantigene A, B, H kommen nicht nur auf den Erythrozyten des Menschen, sondern auch auf Gewebszellen und in Sekreten (Speichel, Magensaft u.a.) vor (5, 31, 154). Da noch nicht eindeutig geklärt ist, ob die Blutgruppensubstanzen tierischer Herkunft untereinander und mit der menschlicher Gruppensubstanz der jeweiligen serologischen Spezifität absolut identisch sind, spricht man von " -gruppenähnlichen Substanzen" (138). Grundsätzlich ist es nicht zwingend notwendig, daß der gefundene DBA-Rezeptor eine Blutgruppen-verwandte Substanz verkörpert. Es kann sich ebenso gut um eine andere Form eines zellulären Oberflächenantigens handeln, wie es beispielsweise auch Histokompatibilitätsantigene darstellen.

Ausschlaggebend für die Bindung eines Lektins ist nicht nur die endständige Kohlenhydratgruppe Gal-NAC, sondern ebenfalls die Tertiärstruktur des gesamten Rezeptors. Zur Aufklärung der sterischen Chemie der DBA-Rezeptoren trugen die Arbeiten von Muramatsu et al. entscheidend bei. Seine unterschiedlichen Ergebnisse bei Benutzung von

Lektinen mit ausschließlicher Gal-NAC-Affinität, ließen ihn zu dem Schluß kommen, daß das Kohlenhydratgrundgerüst (sog. "Embryoglycan"), welches die endständige Gruppe Gal-NAC des Rezeptors trägt, ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Bindung spielt (100).

Mit Hilfe spezieller biochemischer Methoden gelang ihm die Isolierung von DBA-Rezeptoren verschiedener Zellen der Maus. Anhand von Untersuchungen an Zelllinien und Geweben (embryonale Karzinomzellen verschiedener klonaler Linien, Mäuseembryozellen, Zellen des Gastrointestinaltrakts adulter Mäuse etc.) wies er nach, daß sogar DBA-Rezeptoren untereinander keineswegs vollkommen identisch sind (2, 45, 90, 91). So fand er DBA-Rezeptoren mit teils niedermolekularen, aber auch teils mit mittel- und hochmolekularen Kohlenhydratketten.

Seine Ergebnisse an Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades bewiesen außerdem die diesbezüglich signifikante Veränderung des Kohlenhydratprofils von DBA-Rezeptoren. So beschreibt Muramatsu, daß hochmolekulare Glycopeptide in der DBA-Rezeptorstruktur in EC-Zellen und Mäusezellen vor der Implantation vorkommen, jedoch nicht mehr in deren differenzierten Derivaten (45, 60, 88, 89). Muramatsu geht in seinen Schlußfolgerungen nicht näher auf einen Zusammenhang zwischen blutgruppenähnlichen Substanzen und den von ihm isolierten DBA-Rezeptoren ein, weist jedoch darauf hin, daß die DBA-Rezeptoren mit bestimmten Antigenen, wie etwa mit dem Forssman-Antigen (A-ähnliche Substanz!) verwandt sind (45).

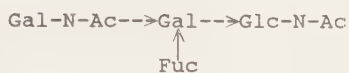
In Tabelle 6 (43) sind einige Antigene der in Frage kommenden Gruppen zusammengestellt. Diese Tabelle zeigt auch im Vergleich die Struktur von B- und H-Antigenen.

Tabelle 6 (43)

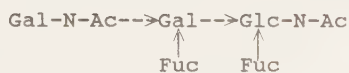
BLUTGRUPPEN-
ANTIGEN

K O H L E N H Y D R A T A N T E I L

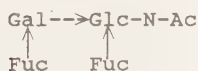
A



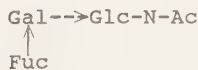
A Le^d



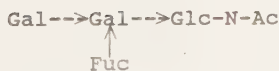
Le^d



H



B



FORSSMANN-
ANTIGEN



Im Zusammenhang mit der Expression blutgruppenähnlicher Substanzen auf Elementen des Blutgefäßsystems, sind insbesondere die Arbeiten von Szulman (143, 144) und Oriol (99) zu erwähnen.

Szulman fand A-, B-, H-Substanzen in der Intima aller Blutgefäße des Menschen, sowohl in der prä- als auch postpartalen Phase der Entwicklung. Oriol beschreibt blutgruppen(ähnliche) Substanzen beim Menschen, bei Affen und Nagern. Bei letzterer Spezies finden sich diese Substanzen nur in sezernierenden Drüsen, nicht jedoch auf dem Endothel oder auf Erythrozyten.

Seine Ergebnisse seien der Übersicht halber tabellarisch zusammengefaßt:

Vorkommen von A-, B-, H-Substanzen

SPEZIES	SEKRETE	VASKULÄRES ENDOTHEL	ERYTHROZYTEN
Nager	+	-	-
Affen (Pavian)	+	+	-
Anthropoide Affen und Mensch	+	+	+

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen Oriols sei auch auf die Untersuchungen von Breimer hingewiesen (20). Er beschreibt die Stammspezifität der Expression blutgruppenähnlicher Substanzen und findet im Gegensatz zu Oriol solche auf Erythrozyten der Ratte (black-white und white Ratte). Im Gastrointestinaltrakt der black-white-Ratte findet er A-Aktivität, nicht jedoch auf deren Erythrozyten. Dagegen beschreibt er B-Aktivität im Gastrointestinaltrakt und auf Erythrozyten beider Stämme.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen somit die Befunde von Oriol in dem Sinne, daß nunmehr auch ein

Nagerstamm bekannt ist, nämlich die NMRI-Maus, welche während der Embryogenese A-ähnliche Determinanten exprimiert.

Die Expression blutgruppenähnlicher Substanzen ist kein konstant vorhandenes Merkmal, sondern variiert je nach Entwicklungszustand und Differenzierungsgrad.

Szulman (143) fand A-, B-, H-Determinanten in fast allen Geweben des menschlichen Embryos ab der 5. Woche, mit Ausnahme der Leber, Nebenniere und des ZNS, von denen er annimmt, daß deren A-, B-,H-Expression zum untersuchten Zeitpunkt bereits verschwunden ist. Nur in geschichteten Epithelien und den Endothelien aller Blutgefäße waren A-, B- oder H-Substanzen auch in der postpartalen Zeit nachweisbar. Alle übrigen Gewebe verloren die Antigen-Expression zu einem, für jedes Organ charakteristischen Zeitpunkt.

Bei der Untersuchung von Rattenfeten fanden Mollicone et al. (85) am 12., 13. und 14. d.p.c. weder A-, B- noch H-Aktivität auf sensorischen Zellen der Riechschleimhaut und des Innenohrs. Vom 15. d.p.c. an konnten sie zunehmende Expression sowohl von A- als auch B-Aktivität feststellen, die teilweise schon bald wieder verschwand, teils aber auch bis weit in die postpartale Phase hinein beibehalten wurde.

Ähnliche Befunde hinsichtlich A-, B-, H-Expression von Zellen der Epidermis von Mensch, Mäusen und Ratten erhob Dabelsteen (31, 105). Je nach Region und Reifungsstadium der Epidermis konnte er eine Expression von A-, B-, H-Antigenen finden. Er betont ausdrücklich den möglichen Zusammenhang des Auftretens von Blutgruppensubstanzen auf Zellen in der Umgebung des Blutgefäßsystems und der am Blutgefäßsystem stattfindenden Lektinbindung.

Dabelsteen wies weiterhin die Veränderung der Antigenexpression (A, B, H) im Verlauf der Differenzierung menschlicher Epidermis nach (31). Er beschreibt, daß parallel zur schrittweisen Reifung eine Kettenverlängerung und Verzweigung der Antigene bzw. deren

Vorläuferstrukturen vor sich gehen.

Auch Hakomori et al. bestätigt das Auftreten von verzweigten Antigenmolekülen als Produkt der Differenzierung und stellt den Gegensatz zum verzweigten fetalen Antigen am Beispiel des menschlichen Erythrozyten dar (58, 59).

Feizi (42, 43, 69) und Reibel et al. (105) bestätigen prinzipiell die Ergebnisse der genannten Autoren, jedoch mit dem Unterschied, daß die von ihnen untersuchten I-, i- und SSEA 1-Antigene der Maus in undifferenzierten Zellen verzweigte Strukturen, dagegen im differenzierten Zustand eine lineare Struktur besitzen.

Ausprunk (4) beschreibt die Synthese zweier verschiedener Klassen von Glycoproteinen, welche möglicherweise als Rezeptoren auf Zellen des Blutgefäßsystems agieren. Je nach Differenzierungsgrad bilden Zellen von Blutgefäßen der Chorioallantoismembran des Huhns nicht-schwefelhaltige Glycoproteine, die zellständig bleiben (frühe Blutgefäße), während die an den Extrazellulärraum abgegebenen Glycoproteine reifer Gefäße, schwefelhaltig sind.

Ein weiteres Beispiel der variierenden Glycoproteinexpression der Gefäßendothelien stammt aus der Transplantationsforschung (151). Überträgt man Hautstückchen eines Ia-positiven Mäusestammes auf Ia-negative Empfängermause, so kommt es zur Expression des Ia-Antigens ausschließlich auf den Endothelzellen des Transplantats. Die Intensität jedoch ist in ausgeprägter Weise abhängig von dem Schweregrad der Abstoßungsreaktion. Dies beinhaltet nicht nur den Einfluß lokaler Faktoren, sondern auch eine Immunmodulation des Empfängertieres findet unmittelbaren Niederschlag auf die Ia-Expressionsintensität der vom Spender stammenden Endothelien.

Weitere wichtige Hinweise auf die Veränderung von Blutgruppensubstanzen im Verlauf der pathologischen Entwicklung stammen aus der Tumorforschung. Verschiedene Autoren fanden eine abweichende Expression im Verlauf der Kanzerogenese (5, 155). Während z.B. bei Individuen der

Blutgruppe A diese u.a. auch in der Magenschleimhaut exprimiert wird, verlieren Patienten mit Magenkarzinom häufig dieses Merkmal. Demgegenüber beschreiben Yokota et al. (155) das häufige Auftreten von Blutgruppensubstanzen während der Karzinogenese des Colon beim Menschen. Hakomori (58, 59) zieht Vergleiche zwischen dem Antigenprofil fetaler, adulter und tumorös entarteter Zellen, wobei er das der tumorösen als eine Reexpression fetaler Zellen beschreibt.

Die Bedeutung der variierenden Expression von Zelloberflächenantigenen, bzw. deren variierende Lektinaffinität während Embryo-, Feto- und Kanzerogenese, ist unbekannt.

Die Beantwortung dieser Frage wurde mit vielversprechendem Erfolg von Edelmann angegangen. Seine Studien hinsichtlich des Auftretens von Zelladhäsionsmolekülen bei embryonalen gestaltgebenden Prozessen, seien an dieser Stelle in aller Kürze rekapituliert.

Als erster isolierte er aus der Oberfläche von Zellen des ZNS des Hühnerembryos ein Glycoprotein (sog. "N-Cam" = neural cell adhesion molecule), welches im Verlauf der Differenzierung sowohl örtlich als auch zeitlich unterschiedlich exprimiert wird. Dieses Glycoprotein vermittelt die Adhäsion ("cell-cell-recognition") zwischen Neuronen untereinander, aber auch die zwischen Neuronen und gestreifter Muskulatur. Dabei nimmt es eine Schlüsselstellung bei primären Induktionsprozessen (im Bereich Neuralplatte, -rohr, Somiten) als auch bei später auftretenden induktiven Vorgängen (Neuralrohr, Augen-, Ohrbläschen etc.) ein (36, 37, 38, 54, 63, 149).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ebenfalls eine Variation der Expression der DBA-Liganden auf den Gefäßendothelien mit fortschreitender Entwicklung beschrieben. Prinzipiell gleichen somit diese Befunde denen anderer Autoren, welche bereits an anderen Zellsystemen die Zusammenhänge zwischen Differenzierung und Antigen-(Hapten)-Expression beschrieben haben.

In meinen histologischen Gefäßdarstellungen innerhalb des ZNS ist aber zusätzlich die Möglichkeit gegeben, daß auch indirekte Einflüsse des Parenchyms, im Sinne einer morphogenetischen Wechselwirkung, die Haptenexpression der Gefäßendothelien mitbestimmen. Trotzdem letztere Frage in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden kann, stellt sich aber dadurch ein Ausblick auf die gegenseitige Abhängigkeit zwischen Gefäßsystem und der ZNS-Organogenese im Sinne des Schichtaufbaus. Es ist durchaus vorstellbar, daß die DBA-affinen Haptenstrukturen der primitiven Endothelzellen, einen neurovaskulären bzw. gliovaskulären Kontakt herstellen und somit eine ähnliche Rolle in der Entwicklung des ZNS spielen, wie das von Edelmann entdeckte N-Cam in der induktiven Phase des Hühnerembryos.

Daß ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Blutgefäßsystems und der Zytodifferenzierung besteht, erscheint bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse als wahrscheinlich: In der Umgebung undifferenzierter Zellen der VZ war eine hochspezifische DBA-Affinität des Blutgefäßsystems zu finden. Besonders trat dies an den kortikalen Abschnitten des Telencephalon zutage, wo die Differenzierung relativ spät beginnt. Mit fortschreitender Differenzierung des Nervensystems nahm die DBA-Affinität des Blutgefäßendothelien ab. Dies würde, analog zu den oben erwähnten, sterischen Besonderheiten von Lektin-Rezeptoren, einer Veränderung des Kohlenhydratgrundgerüsts der DBA-Rezeptoren im Verlauf der Entwicklung entsprechen.

Ein solcher, wie oben aufgestellter Zusammenhang zwischen Blutgefäßsystem und ZNS ist auch durchaus plausibel, in Anbetracht der histogenetischen Beziehungen zwischen Gefäßen und Gehirnzellen, wie sie in zumeist elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Darstellung kamen:

Stewart (139) gelang mit Hilfe eines mikrochirurgischen Experiments an Huhn-Wachtel-Chimären der Nachweis, daß sich die Charakteristika der Blut-Hirn-Schranke

ausschließlich im ZNS, als Reaktion auf einen Faktor der neuralen Umgebung, entwickeln können.

Bär (9) beschreibt die vaskulären Strukturen des sich entwickelnden ZNS als Leitschienen für die Ausrichtung von Astrogliazellen und als unabdingbare Voraussetzung der embryonalen Gliogenese und der Migration von Neuroblasten. Phelps (102) beobachtete eine Beziehung zwischen Elementen des ZNS und des Blutgefäßsystems während der prä- und postnatalen Entwicklung der Ratte, ohne dies jedoch weiter zu diskutieren. Während im intrauterinen Leben die Neuroblasten direkten Kontakt mit Gefäßen haben, werden letztere in der postpartalen Phase von astrozytären Ausläufern umgeben und verlieren so den direkten Kontakt zum Blutgefäßsystem.

Conradi (30) zeigt die Möglichkeit auf, daß die Vaskularisierung des ZNS an dessen Reifung gebunden ist, was keinen zufälligen Prozeß darstellt, sondern einen Vorgang, der durch die Faktoren des ZNS provoziert wird.

Auch aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie besteht Grund zur Annahme einer gegenseitigen Beeinflussung von ZNS und Blutgefäßsystem während der Embryogenese mittels der DBA-Rezeptoren.

In welcher Form diese Abhängigkeit besteht, kann beim gegenwärtigen Stand der Kenntnisse noch nicht beantwortet werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Ferritin-DBA sind geeignet, in weiteren Studien die Assoziation von Blutgefäßendothelien und sich teilendem Neuropil zu verifizieren.

6. A U S B L I C K

Mit der hier vorgestellten DBA-spezifischen Darstellbarkeit der Endothelien bereits in der frühesten Phase der Gefäßentwicklung, steht eine leistungsstarke und hochspezifische Methode für die allgemeine Routine-Histologie mit Paraffineinbettung der Gewebe zur Verfügung. Dies ist insbesondere für das Darstellen von Übersichtssituationen im Lichtmikroskop wichtig und stellt somit eine bedeutsame Ergänzung der elektronenmikroskopisch ausgerichteten Forschungen dar. Außerdem wird auch für die teratologische Forschung die Möglichkeit gegeben, auf einer breiten Basis die Bedeutung des Blutgefäßsystems bei der Pathogenese histologischer Abweichungen zu untersuchen (44). Letzter Aspekt ist nicht nur wegen den nutritiven Funktionen des Blutgefäßsystem von Interesse, sondern vor allem wegen der engen morphogenetischen Wechselwirkungen zwischen Endothelien, Glia und Neuronen.

ERGÄNZUNG

Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit, wurde durch die Publikation von B.A.J. Ponder, M.F.W. Festing und M.M. Wilkinson ("An allelic difference determines reciprocal patterns of expression of binding sites for DBA in inbred strains of mice" J. Embryol. exp. Morph. 87, 229-239, 1985) ein interessanter, diese Arbeit ergänzender Befund bekannt:

Auf der Suche nach histologischen Markern für Chimärismus prüften Ponder et al. 29 Mäusestämme u.a. auf die DBA-Affinität des Gefäßendothels. Ponder fand dabei nicht nur DBA-Affinität am Gefäßendothel adulter Mäuse (DDK, SWR, RIIro), sondern auch DBA-positive Endothelien bei embryonalen Mäusen (C57Bl/6J, RIIro). Die Tiere des C57BL/6J-Stammes zeigten dabei eine nur an großen Gefäßen auftretende, fleckförmige Färbung in der DBA-Peroxidase-Reaktion, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde.

Außerdem erwähnt Ponder, daß die Ursache der variierenden DBA-Affinität im Verlauf der Embryogenese möglicherweise in der gewebs- und zeitspezifischen Aktivität von Glycosyltransferasen liegt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die DBA-Affinität an histologischen Schnitten formalinfixierter und paraffineingebetteter Mäuseembryonen der Stämme NMRI, CBA, C57Bl6 und Balb/c während der Organogenese (7. bis 13. d.p.c.) mit einem HRP-Konjugat untersucht.

Im Gegensatz zu ähnlichen Untersuchungen konnte eine hochspezifische und leistungsstarke, regional und zeitlich variierende Anfärbung aller Blutgefäßendothelien ausschließlich bei embryonalen Tieren des NMRI-Stammes festgestellt werden. Andere Gewebe, mit Ausnahme des Darms, zeigten keine DBA-Affinität. Am Beispiel des sich entwickelnden ZNS, welches eine klare Unterscheidung in Proliferations- und Migrationszone (undifferenzierte - sich differenzierende Zellen) erlaubt, wurde das histologische DBA-Bindungsmuster an die dort vorkommenden Gefäßendothelien näher beschrieben:

Die Endothelien des perineuralen Mesenchyms zeigten bereits ab dem 8. d.p.c. schwache, anschließend deutliche, am 12. und 13. d.p.c. schließlich abnehmende DBA-Affinität. Am 10. d.p.c. traten zum ersten Mal, mit Ausnahme des Telencephalon, im Parenchym des ZNS DBA-positive Endothelien auf. Im Telencephalon war dies erst ab dem 11. d.p.c. der Fall. Die Bindungsfähigkeit der Blutgefäßendothelien für das DBA-Konjugat, nahm am 13. d.p.c. vor allem im spinalen Teil des Neuralrohrs, aber ebenso im Met-, Mes- und Diencephalon deutlich ab. Im Myelencephalon war zu diesem Zeitpunkt keine DBA-Bindung an Gefäßendothelien zu beobachten. Im Gegensatz dazu, zeigten Gefäße des Telencephalon am 13. d.p.c. noch immer eine deutliche DBA-Affinität. Auch an Gefäßen im Bereich der Augenanlage, sowie in und um die Spinalganglien und verschiedene Ganglien von Gehirnnerven, konnte eine zeitlich und örtlich variierende Lektinbindung

festgestellt werden.

Die wahrscheinliche Identität der DBA-affinen Rezeptoren auf den Blutgefäßendothelien mit humanen Blutgruppen-A-ähnlichen Substanzen wird diskutiert. Weiterhin kommt die eventuelle funktionelle Bedeutung des entwicklungsspezifischen Auftretens von DBA-affinen Determinanten bei der Zytodifferenzierung des Blutgefäßsystems und der Organogenese des ZNS zur Diskussion.

7. A B S T R A C T

The specific labeling of blood vessels of the NMRI-mouse during organogenesis by use of Dolichos biflorus-agglutinin

The histological DBA-affinity pattern has been examined in formalin-fixed and paraffin-embedded embryos of mice (NMRI, CBA, C57Bl6, Balb/c) during organogenesis (7. - 13. d.p.c.) by use of a horseradish-conjugated lectin.

An unexpected finding, observed only with NMRI-mice embryos, which was not reported in similar studies by other authors, was a highly specific labeling of all blood vessels. This affinity pattern, however, was not homogenously distributed within the embryo, but clearly showed varying intensities with advancing cell differentiation.

These findings were intensely studied at the embryonal CNS, which allows a clear distinction of undifferentiated and differentiating cells (zone of proliferation, zone of migration).

Spinal cord: The vessels of the matrix zone were intensely labeled from 10. to 13. d.p.c. . The intermediary zone revealed DBA-positive vessels only on 11. and 12. d.p.c. . The vessels of the spinal ganglia were DBA-positive from day 12 onwards.

Myelencephalon: There was a rather narrow period of strong DBA- affinity of the VZ-vessels only on g.d. 10. This pattern regresses to an undetectable level within the next two gestation days. DBA-labeling of the vessels within the intermediary zone starts on g.d. 12.

Met- and Mesencephalon: This CNS region showed the latest appearance of DBA-labeling within its VZ (g.d. 11). This pattern remained constant up to g.d. 13.

Diencephalon: On g.d. 10 the vessels within the VZ started with a weak DBA-affinity. This labeling was already intense on g.d. 11 and continuously declined again from

g.d. 12 onwards.

Telencephalon: The vessel endothelium of the VZ-layer showed a marked DBA-affinity from g.d. 11 onwards. The labeling intensity of the VZ-vessels was very strong on day 13.

It is mentioned that the DBA-affinity of cells can be deduced to an expression of a cell surface carbohydrate chain, which is either identical with or closely related to human blood group antigen A of the ABO system. Furthermore the biological role of this antigen - a possible functional dependency of CNS organogenesis and cytodifferentiation of vessels - is discussed.

8. A B K Ü R Z U N G E N

d.p.c. = dies post conceptionem

A., Aa. = Arteria, Arteriae

V., Vv. = Vena, Venae

Ggl. = Ganglion

ZNS = Zentralnervensystem

VZ = Ventrikulärzone

SZ = Subventrikuläre Zone

IZ = Intermediärzone

MZ = Marginalzone

HRP = horseradish (engl., Meerrettich) peroxidase

Con A

NPA

LBA

LPA

PNA

PNA

SBA

UEA

WGA

Abkürzungen für Lektine
siehe bitte
Tabelle 3, Kapitel 2.3.7.

9. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Allsopp G., Gamble H.J.: Light and electron microscopic observations on the development of the blood vascular system of the human brain. *J. Anat.* 128, 461-477, 1979
- 2 Arita Y., Ogota S., Ozawa M., Muramatsu T.: Distinct properties of receptors for DBA isolated from small intestine of adult mice and endoderm cells of early embryos and teratocarcinomas. *Differentiation* 28, 254-259, 1985
- 3 Auerbach R., Alby L., Grieves J., Joseph J., Lindgren C., Morrissey L. W., Sidky Y.A., Watt S.L.: Monoclonal antibody against angiotensin-converting enzyme: its use as a marker for murine, bovine, and human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 79, 7891-7895, 1982
- 4 Ausprunk D.H.: Synthesis of glycoproteins by endothelial cells in embryonic blood vessels. *Dev. Biol.* 90, 79-90, 1982
- 5 Bali J.P., Magons R., Lecon C., Mousseron-Canet M.: Presence of bloodgroup H antigen on a carcinoembryonic antigen, and its enzymatic modification into blood group A and B specificities. *Cancer Research* 36, 2124-2129, 1976
- 6 Barondes S.H. : Soluble Lectins: a new class of extracellular proteins. *Science* 223, 1259-1264, 19847

- 7 Bär Th., Wolff J.R.: The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. *Z. Zellforsch.* 133, 231-248, 1972
- 8 Bär Th., Wolff J.R.: Development and adult variations of the wall of brain capillaries in the neocortex of rat and cat. The cerebral vessel wall. (J. Cervos-Navarro, ed.), Raven Press, New York, 1976, 1-6
- 9 Bär Th.: Patterns of vascularization in the developing cerebral cortex. Development of the vascular system. (Ciba foundation symposium 100), Pitman Books, London, 20-36
- 10 Bee J.A.: Glycoconjugates of the avian eye: the development and maturation of the neural retina as visualized by lectin binding. *Diff.* 23, 128-140, 1982
- 11 Bell C.M., Skerrow C.J.: Factors affecting the binding of lectins to normal human skin. *British J. of Dermatol.* 111, 517-526, 1984
- 12 Bernhard W., Avrameas S.: Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Con A. *Exp. Cell Res.* 64, 232-236, 1971
- 13 Biesold D., Matthies H.: *Neurobiologie*, Fischer-Verlag, Stuttgart - New York, 1977
- 14 Blanks J.C., Johnson L.V.: Selective lectin binding of the developing mouse retina. *J. comp. Neurology* 221, 31-41, 1983

- 15 Bog-Hansen T.C., Breborowicz J., Franz H.: Report on the proposals for an International Working Party on Standardization of Lectins for Diagnosis. Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Vol II, (T.C. Bog-Hansen, ed.), W. de Gruyter, Berlin - New York, 1982, 791-793
- 16 Bog-Hansen T.C., Spengler G.A. (eds.): Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Vol III, W. de Gruyter, Berlin - New York, 1983
- 17 Borisch B., Möller P., Harms D.: Lektin UEA I als Marker in der Differentialdiagnose von Gefäßtumoren. Pathologie 4, 241-243, 1983
- 18 Boulder Committee: Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. Anat. Rec. 166, 257-263, 1970
- 19 Boyd W.C.: The lectins: their present status. Vox sang. 8, 1-32, 1963
- 20 Breimer M.E., Hansson G.C., Karlson K.-A., Leffler H.: Human blood group A-positive and -negative strains of rat. Chemical basis as shown by fucolipids of small intestine. FEBS letters 114, 51-56, 1982
- 21 Breipohl W.: Entwicklung und gliöse Beziehung der Basalmembran der Kapillaren des Mäusegehirns. Acta anat. 69, 393-408, 1968
- 22 Brown J.C: Lectins. Intern. Rev. Cytol. 52, 277-337, 1978
- 23 Brückner G., Biesold D.: WGA indicates the commencement of neuronal differentiation in the embryonic brain. A comparative carbohydrate histochemical study. Acta histochem. 69, 231-242, 1981

- 24 Byers R.L., Snyder G.K.: Effects of maturation on tissue capillarity in chicken. *Resp. physiol.* 58, 137-150, 1984
- 25 Camosso M.E., Roncali L., Ambrosi G.: Vascular patterns in the chick embryo spinal cord in normal and experimentally modified development. *Acta anat.* 95, 346-367, 1976
- 26 Carter W.G., Etzler M.E.: Isolation, characterization and subunit structures of multiple forms of DBA. *J. of Biol. Chemistry* 250, 2756-2762, 1975
- 27 Chavez D.J., Enders A.C.: Temporal changes in lectin binding of peri-implantation mouse blastocysts. *Dev. Biol.* 87, 267-276, 1981
- 28 Chavez D.J., Enders A.C.: Lectin binding of mouse blastocysts. *Biol. of Reprod.* 26, 545-552, 1982
- 29 Codegone M.L., Bussolati G., Spinnato M.R., Stramignoni A.: Selective binding of PNA by T lineage lymphocytes in paraffin sections. *Bas. Appl. Histochem.* 27, 177-182, 1983
- 30 Conradi N.G., Sourander P.: The early internal vascularization of the rat brain. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 50, 221-226, 1980
- 31 Dabelsteen E., Buschard K., Hakomori S., Young W.: Pattern of distribution of blood group antigens on human epidermal cells during maturation. *J. Invest. Dermatol.* 82, 13-17, 1984
- 32 De Felici M.: Binding of fluorescent lectins to the surface of germ cells from fetal and early postnatal mouse gonads. *Gamete Research* 10, 423-432, 1984

- 33 Doyle R. J.: Lectins in diagnostic microbiology. Biotechs, E.V. Laboratories INC, San Mateo, U.S.A. 1, 1982
- 34 Duckett S.: The germinal layer of the growing human brain during early fetal life. Anat. Rec. 161, 231-246, 1968
- 35 Duckett S.: The establishment of internal vascularization in the human telencephalon. Acta anat. 80, 107-113, 1971
- 36 Edelman G.M., Gallin W.J., Delouree A., Cunningham B.A., Thiery J.P.: Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 4384-4388, 1983
- 37 Edelman G.M.: Cell adhesion molecules. Science 219, 450-457, 1983
- 38 Edelman G.M.: Zelladhäsionsmoleküle und embryonale Musterbildung. Spektrum der Wissenschaft 6, 62-74, 1984
- 39 Ernst C., Thurin J., Atkinson B., Wurzel H., Herlyn M., Stromberg N., Civin C., Koprowsky H.: Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal and malignant fixed human tissues. AJP 117, 451-461, 1984
- 40 Etzler M.E., Kabat E.A.: Purification and characterization of a lectin with blood group A specificity from Dolichos biflorus. Biochem. 9, 869-877, 1970

- 41 Etzler M.E.: Distribution and properties of the Dolichos biflorus lectin: a model for exploring the role of lectins in plants. Chemical Taxonomy, Molecular Biology, and Function of Plant Lectins. A.R. Liss, INC., New York , 1983, Seite 197-207
- 42 Feizi T., Childs R.A.: Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation antigens, tumour-associated antigens and components of receptor systems. TIBS 1, 24-29, 1985
- 43 Feizi T.: Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. Nature 314, 53-57, 1985
- 44 Fraser B.A., Travill A.A.: The relation of aberrant vasculogenesis to skeletal malformations in the hamster fetus. Anat. Embryol. 154, 111-120. 1978
- 45 Fujimoto H., Muramatsu T., Urushihara H., Yanagisawa K.O.: Receptors to DBA. A new cell surface marker common to teratocarcinoma cells and preimplantation mouse embryos. Diff. 22, 59-61, 1982
- 46 Fujita S.: The matrix cell and cytogenesis in the developing CNS. J. Comp. Neurol. 120, 37-42, 1963
- 47 Gallagher J.T.: Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification. Biosc. Reports 4, 621-623, 1984
- 48 Gardeter R., Courtois M., Bisconte J.C.: Prenatal development of mouse central nervous structures: time of origin and gradients of neuronal production. J. Hirnforsch. 23, 415-431, 1982

- 49 Geelen J.A.G., Langmann J.: Closure of the neural tube in the cephalic region of the mouse embryo. *Anat. Rec.* 189, 625-640, 1977
- 50 Goldstein I.J., Hayes C.E.: The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 127-340, 1978
- 51 Goldstein, I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N.: What should be called a lectin? *Nature*, 285, 66, 1980
- 52 Goldstein I.J.: Lectins: an overview. Biotech, E.Y. Laboratories, San Mateo, U.S.A., 1, 1981
- 53 Green E.L. (ed.): *Biology of the Laboratory Mouse*. Dover Publications, INC, New York, 1968
- 54 Greenberg M.E., Brackenburt R., Edelmann G.M.: Alteration of neural cell adhesion molecule (N-Cam) expression after neuronal cell transformation by Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 969-973, 1984
- 55 Greenwalt D.E., Mather J.H.: Characterization of an apically derived epithelial membrane glycoprotein from bovine milk, which is expressed in capillary endothelia in diverse tissues. *J. Cell Biol.* 100, 397-408, 1985
- 56 Gualandris L., Rouge P., Duprat A.M.: Membrane changes in neural target cells studied with fluorescent lectin probes. *J. Embryol. exp. Morph.* 77, 183-200, 1983

- 57 Haar J.L., Ackerman G.A.: A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat. Rec.* 170, 199-224, 1970
- 58 Hakomori S.: Blood group A B H and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism and their developmental change. *Seminars in Hematology* 18, 39-62, 1981
- 59 Hakomori S.: Glycosphingolipids as differentiation-dependant tumour-associated markers and as regulators of cell proliferation. *TIBS* 9, 453-458, 1984
- 60 Hamada H., Sato M., Murata T., Muramatsu T.: Differential expression of lectin receptors in germ layers of the mouse cylinder and teratocarcinomas. *Exp. Cell Res.* 144, 498-494, 1983
- 61 Hamada H.: Distribution of glycoconjugates in normal rat kidney by using HRP-labeled lectins. *Acta Histochem. Cytochem.* 16, 189-206, 1983
- 62 His W.: Die Neuroblasten und deren Entstehung im embryologischen Mark. *Arch. Anat. Physiol., Abt. Anat.* 2, 249-300, 1889
- 63 Hoffman S., Sorkins B.C., White P. C., Brackenburg R., Mailhammer R., Rutishauser U., Cunningham B.C., Edelmann G.M.: Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J. Biol. Chemistry* 257, 7720-7729, 1982

- 64 Holmdahl D.E.: Die erste Entwicklung des Körpers bei den Vögeln und Säugetieren inklusive dem Menschen, mit besonderer Rücksicht auf die Bildung des Rückenmarks, Zöloms und der entodermalen Kloake, nebst einem Exkurs über die Entstehung der Spina bifida in der lumbosakralen Region. I. Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch 54, 333-384, 1925
- 65 Holthöfer H., Virtanen I., Kariñiemi A.-L., Horima M., Lindner E., Miettinen A.: UEA I as a marker for vascular endothelium in human tissues. Lab. Invest. 47, 60-66, 1982
- 66 Holthöfer H.: Lectin binding sites in kidney. A comparative study of 14 animal species. J. Histochem., Cytochem. 31, 531-537, 1983
- 67 Johanson C.E.: Permeability and vascularity of the developing brain. Brain Res. 190, 5-16, 1980
- 68 Kahle W.: Studien über die Matrixphasen und die örtlichen Reifungsunterschiede im embryonalen menschlichen Gehirn. Dtsch. Zeitschr. f. Nervenheilkunde 166, 273-302, 1951
- 69 Kapadia A., Feizi T., Evans M.J.: Changes in the expression an polarization of blood group I and i antigens in postimplantation embryos and teratocarcinomas of mouse associated with cell differentiation. Exp. Cell Res. 131, 185-195, 1981
- 70 Koch O., Uhlenbruck G.: From "invertebrate" to "in vertebrate" lectins: a review. Biotechs, E.Y.Laboratories,INC, San Mateo, U.S.A., 1, 1982
- 71 Kramer J., Lierse W.: Die postnatale Entwicklung der Kapillarisation im Gehirn der Maus. Acta anat. 66, 446-459, 1967

- 72 Kubasowa T., Köteles G., Varga L P.: Surface alterations of mammalian cells upon radiation as detected by lectin-binding technique. *Int. J. Radiat. Biol.* 40, 187-194, 1981
- 73 Langmann J.: *Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildung.* G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1977
- 74 Leatham A., Atkins N.: Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections. *J. Clin. Pathol.* 36, 747-750, 1983
- 75 Lee M.-C., Damjanow I.: Anatomic distribution of lectin binding sites in mouse testis and epididymis. *Diff.* 27, 74-81, 1984
- 76 Le Hir M., Dubach V.C.: The cellular specificities of lectin binding in the kidney. *Histochem.* 74, 521-530, 1982
- 77 Lis H., Sharon N.: *Lectins: their chemistry and application to immunology.* The Antigens (M. Sela, ed.), Vol.IV, Academic Press, New York, 1977, 429-528
- 78 Martinozzi M., Moscona A.A.: Binding of Con A and agglutination of embryonic neural retina cells. *Exp. Cell Res.* 94, 253-266, 1975
- 79 Mc. Lone D.G., Bondareff W.: Developmental morphology of the subarachnoid space and contiguous structures in the mouse. *Am. J. Anat.* 142, 273-294, 1975
- 80 Mc. Lone D.G.: The subarachnoid space: a review. *Child s Brain* 6, 113-130, 1980

- 81 Meller K., Breipohl W., Glees P.: Early cytological differentiation in the cerebral hemisphere of mice. *Z. f. Zellforsch.* 72, 525-533, 1966
- 82 Menkes B., Alexandru C., Tudose O., Checic J.: Untersuchung über die Stratum geniculatum im ZNS. *Z. mikroskop. anat. Forsch.* (Leipzig) 89, 62-78, 1975
- 83 Miettinen M., Holthöfer H., Lektio V.-P., Miettinen A.: UEA I as a marker for tumors derived from endothelial cells. *Am. Soc. Clin. Pathol.* 79, 32-36, 1983
- 84 Miyake T.: Identification of neonatal brain macrophages by lectin histochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* 17, 279-282, 1984
- 85 Mollicone R., Troyan J., Oriol R.: Appearance of H and B antigens in primary sensory cells of the rat olfactory apparatus and inner ear. *Dev. Brain Res.* 17, 275-279, 1985
- 86 Möller P.: Peanut lectin: a useful tool for detecting Hodgkin cells in paraffin sections. *Virchows Arch. (Pathol Anat.)* 396, 313-317, 1982
- 87 Mukai K., Rosai J., Burgdorf W.H.C.: Localization of factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method. *Americ. J. of Surgical Pathol.* 4, 273-276, 1980
- 88 Muramatsu T., Gachelin G., Nicolas J.F., Condamine H., Jakob H., Jakob F.: Carbohydrate structure and cell differentiation: unique properties of fucosylglycopeptides isolated from embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2315-2319, 1978

- 89 Muramatsu T., Gachelin G., Damonville M., Delarbre C., Jakob F.: Cell surface carbohydrates of embryonal carcinoma cells: side chains of F 9 antigen and of receptors to two lectins, FBP, PNA. *Cell* 18, 183-1191, 1979
- 90 Muramatsu T., Muramatsu H., Kasai M., Habu S., Okumura K.: Receptors for DBA: new cell surface markers on a spontaneous leukemia. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 96, 1547-1553, 1980
- 91 Muramatsu T., Muramatsu H., Ozawa M.: Receptors for DBA on embryonal carcinoma cells. *J. Biochem.* 89, 473-481, 1981
- 92 Nemancic M.K., Whitehead J.S., Elias P.M.: Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 887-897, 1983
- 93 Neuberger A.: What lectins and carbohydrates are made for? *Biol. Cell* 51, 113-114, 1984
- 94 Nickel R., Schummer A., Seiferle E.: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.* Band IV, P. Parey Verlag, Berlin - Hamburg, 1975
- 95 Nicolson G.L.: The interaction of lectins with animal cell surfaces. *Inter. Rev. Cytol.* 39, 89-175, 1974
- 96 Nils Ohre Nilsen: Endothelial changes and microvascular leakage due to hyperthermia in chick embryos. *Virch. Arch. (Cell Pathol.)* 46, 165-174, 1984

- 97 Noguchi M., Noguchi T., Watanabe M., Muramatsu T.: Localization of receptors for DBA in early post implantation embryos in mice. *J. Embryol. exp. Morph.* 72, 39-52, 1982
- 98 Oppenheimer S.B.: Interactions of lectins with embryonic cell surfaces. *Curr. Top. Dev. Bio.* 11, 1-16, 1977
- 99 Oriol R., Cooper J.E., Davis D.R., Keeling P.W.N.: A, B, H antigens in vascular endothelium and some epithelial tissues of baboons. *Lab. Invest.* 50, 514-518, 1984
- 100 Ozawa M., Muramatsu T.: The glycoprotein-bound large carbohydrates from embryonal carcinoma cells carry receptors for several lectins recognizing N-acetylgalactosamine and galactose. *J. Biochem.* 97, 317-324, 1985
- 101 Pereira M.E.A., Lourdes M.A., Villalta F., Andrade A.F.B.: Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 152, 1375-1392, 1980
- 102 Phelps C.H.: The development of glio-vascular relationships in the rat spinal cord. *Z. Zellforsch.* 128, 555-563, 1972
- 103 Ponder B.A.J., Wilkinson M.M.: Organ-related differences in binding of DBA to vascular endothelium. *Dev. Biol.* 96, 535-541, 1983
- 104 Raedler E., Raedler A., Feldhaus S.: Varying expression of lectin receptors within embryonic cell layers of murine cerebral cortex. *Anat. Embryol.* 162, 21-28, 1981

- 105 Reibel J., Dabelsteen E., Hakomori S., Young W.W., Mackenzie J.C.: The distribution of blood group antigens in rodent epithelia. *Cell Tissue Res.* 237, 111-116, 1984
- 106 Reisner Y., Linker-Israel M., Sharon M.: Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by use of PNA. *Cell Immunology* 25, 119-134, 1976
- 107 Rittman B.R., Mackenzie J.C., Rittman G.A.: Lectin binding to murine oral mucosa and skin. *Archs. oral Biol.* 27, 1013-1019, 1982
- 108 Rodier P.M.: Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev. Med. Child. Neurol.* 22, 525-545, 1980
- 109 Roguet R., Aubery M., Bourrillon R.: Embryo cell surfaces - lectin binding and cell proliferation. *Diff.* 5, 107-113, 1976
- 110 Romeis B.: *Mikroskopische Technik*, R. Oldenbourg Verlag, München - Wien, 1968
- 111 Roncali L., Bosco L.: Relationship between vasculogenesis and morphogenesis in the chick embryo spinal ganglia. *Acta anat.* 106, 473-486, 1980
- 112 Roncali L., Ribatti D., Ambrosi G.: Ultrastructural basis of the vessel wall differentiation in the chick embryo optic tectum. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 83-88, 1985
- 113 Roth J.: The lectins: molecular probes in cell biology and membrane research. *Experimentelle Pathologie*, Suppl 3, G. Fischer Verlag, Jena, 1978, 186 Seiten

- 114 Roth J.: Applications of immunocolloids in light microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 547-552, 1983
- 115 Rugh R.: The mouse. Its reproduction and development. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1968
- 116 Schmid D.O.: Erforschung der Blutgruppen von Rind, Pferd und Huhn. Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München, München 1966, 247 Seiten
- 117 Schoefl G.J.: Studies on inflammation. *Virch. Arch. path. Anat.* 337, 97-141, 1963
- 118 Schoenwolf G.C.: Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Americ. J. Anat.* 169, 361-376, 1984
- 119 Schuler G., Romani N., Fritsch P.O.: Differential lectin binding to mammalian keratinocytes and melanocytes in vitro. *Europ. J. Cell Biol.* 27, 88-95, 1982
- 120 Schuler G., Romani N., Linert H., Shevach E.M., Stingl G.: Subsets of epidermal Langerhans cells as defined by lectin binding profiles. *J. Invest. Dermatol.* 81, 397-402, 1983
- 121 Schulte B.A., Spicer S.S.: Light microscopic detection of sugar residues in glycoconjugates of salivary glands and the pancreas with lectin-HRP-conjugates. II. Rat. *Histochem. J.* 16, 3-20, 1984
- 122 Schwechheimer K., Weiss G., Schnabel P., Möller P.: Lectin target cells in human CNS and the pituitary gland. *Histochem.* 80, 165-169, 1984

- 123 Sharon N., Lis H.: Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177, 949-958, 1972
- 124 Sharon N., Lis H.: Use of lectins for study of membranes. Methods in Membrane Biology, III, Korn (ed.), Plenum Press, New York 1974, 147-201
- 125 Sharon N.: Lectins. Scient. Americ. 236, 108-117, 1977
- 126 Sharon N.: Lectins: use for cell separation. Biotech, E.Y. Laboratories, INC, San Mateo, U.S.A., 1, 1982
- 127 Sharon N.: Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. Immunology Today 5, 143-147, 1984
- 128 Shoukimas G.M., Hind J.W.: The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis. J. Comp. Neur. 179, 795-830, 1978
- 129 Smart I.H.M.: Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the spinal cord in the mouse. J. Anat. 111, 365-380, 1972
- 130 Smart I.H.M.: Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the diencephalon in the mouse as revealed by recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. J. Anat. 113, 109-129, 1972
- 131 Smart I.H.M.: Proliferative characteristics of the ependymal layer during early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. J. Anat. 116, 67-91, 1973

- 132 Smart I.H.M.: A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain. *J. Anat.* 121, 71-84, 1976
- 133 Smart I.H.M., Smart M.: Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon: I: Autoradiographic studies of the histogenesis of the isocortex and adjacent areas. *J. Anat.* 134, 273-298, 1982
- 134 Smart I.H.M.: The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after Thymidine-H injection. *J. Comp. Neur.* 116, 325-347, 1961
- 135 Smart I.H.M., Mc. Sherry M.: Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon: II: histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J. Anat.* 134, 415-442, 1982
- 136 Söderström K.O., Malmi R., Karjalainen K.: Binding of fluorescein-isothiocyanate-conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. *Histochem.* 80, 475-479, 1984
- 137 Spatz H.:
Dtsch. Z. f. Nervenheilkunde 81, 185-188, 1924
- 138 Spielmann W.: Die Blutgruppensubstanzen. *Deutsch. med. Wschr.* 83, 2330, 1958
- 139 Stewart P.A., Wiley M.J.: Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* 84, 183-192, 1981

- 140 Strong L.H.: The first appearance of vessels within the spinal cord of the mammal: their developing pattern as far as partial formation of the dorsal septum. *Acta anat.* 44, 80-108, 1961
- 141 Sturrock R.R.: A quantitative and morphological study of vascularization of the developing mouse spinal cord. *J. Anat.* 132, 203-221, 1981
- 142 Suzuki S., Tsuyama S., Murata F.: Post-embedding staining of rat gastric mucous cells with lectins. *Histochem.* 73, 563-575, 1982
- 143 Szulman A.E.: The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J. Exp. Med.* 111, 785-799, 1960
- 144 Szulman A.E.: The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunfluorescence. The A, B, and H antigens in embryos and fetuses from 18mm in length. *J. Exp. Med.* 119, 503-515, 1964
- 145 Theiler K.: The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1972
- 146 Uhlenbruck G.: Lektine, Toxine und Immunotoxine. *Naturwissenschaften* 68, 606-612, 1981
- 147 Van der Valk M.A., Hageman Ph.: Distribution of lectin receptors in neonatal, embryonic and neoplastic mouse tissue. *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (Bog Hansen, ed.), Vol II, W. de Gruyter, Berlin - New York, 1982

- 148 Vector Laboratories, INC. Katalog 1984, 1429 Rollins Road, Burlingame, CA 94010, U.S.A.
- 149 Vincent M., Duband J.L., Thiery J.P.: A cell surface determinant expressed early on migrating avian neural crest cells. Dev. Brain Res. 9, 235-238, 1983
- 150 Vogel G., Angermann H.: DTV-Atlas zur Biologie, Band 1 und 2, DTV-Verlag, München 1971
- 151 Waal R.M.W.de, Bogman M.J.J., Maas C.N., Cornelissen C.M.H., Tax W.J.M., Coene R.A.P.: Variable expression of Ia antigens on vascular endothelium of mouse skin Nature 303, 426-429, 1983
- 152 Wagner R.C.: Endothelial cell embryology and growth. Adv. Microcirc. 9, 45-75, 1980
- 153 Watanabe M., Muramatsu T., Shirane H., Ugai K.: Discrete distribution of binding sites for DBA and for PNA in mouse organ tissues. J. Histochem. Cytochem. 29, 779-790, 1981
- 154 Winzler R.J.: Carbohydrates in cell surfaces. Ann. Rev. Biochem. 42, 77-115, 1973
- 155 Yokota M., Warner G., Hakomori S.: Blood group A-like glycolipid and a novel Forssman antigen in the hepatocarcinoma of a blood group O individual. Cancer Res. 41, 4185-4190, 1981

D A N K S A G U N G

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für Nuklearbiologie für die freundliche Aufnahme im Institut.

Herrn Prof. Dr. Kriegel danke ich für die Bereitstellung des hervorragenden Arbeitsplatzes.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn PD Dr. Schmahl aussprechen, der die vorliegende Arbeit betreute und mit großem Entgegenkommen und vielen wichtigen Anregungen maßgeblich zum Gelingen beitrug.

Mein Dank gilt auch Frau di Grazia, Frau Senft, Frau Steege und besonders Frl. Huffstadt für die Einweisung in die histologische Arbeitstechnik und die Beratung bei zahlreichen Problemen.

Weiterhin möchte ich mich auch bei meiner Kollegin Sabine Reinöhl-Kompa bedanken, die durch ihre Freundschaft zu einem ausgezeichneten Arbeitsklima beitrug.

Nicht zuletzt sei auch meiner lieben Mutter für ihre stete Unterstützung vielmals gedankt.

LEBENS LAUF

Name: Johanna Plendl
Geburtsdatum: 11. Dez. 1958
Geburtsort: Straubing
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Johann Plendl, Bäckermeister,
gest. 1983
Hildegard Plendl, geb. Fischer

Ausbildung:

Sept. 1965-Juli 1969: Volksschule in Kirchroth
Sept. 1969-Juli 1978: Gymnasium der Ursulinen in
Straubing
Nov. 1978-Febr. 1984: Studium der Tiermedizin an
der Universität in München
7. März 1984: Tierärztliches Staatsexamen
11. Nov. 1984: Approbation
ab Mai 1984: Doktorandin an der GSF in
Neuherberg und Mitarbeit in
einer tierärztlichen Praxis

